

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Siim Uhtjärv

NickFect 51 uued analoogid plasmiidse DNA transportimiseks rakku

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad

Prof Ülo Langel

Piret Arukuusk, *PhD*

TARTU 2014

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Ravimite transport rakku	6
1.2. Rakku sisenevad peptiidid	8
1.2.1. Transportanist NickFectideni	10
1.2.2. RSP-de modifitseerimine	11
1.3. RSP-de rakendamise võimalused inimeste ravis.....	13
1.3.1. Ühendite transport RSP-dega	14
1.3.2. Nukleiinhapete transport RSP-dega.....	16
1.4. RSP-de sisenemismehhanismid	16
1.5. RSP-de toksilisus.....	17
1.6. Tahke faasi peptiidsüntees	18
1.6.1. Sünteesitud peptiidi puhastamine	20
1.6.2. Sünteesitud peptiidi analüüsimine MALDI-TOF meetodiga	20
2. Eksperimentaalne osa.....	22
2.1. Töö eesmärgid	22
2.2. Materjal ja metoodika	22
2.2.1. Peptiidide disain ja süntees.....	22
2.2.2. Transfekteeritavate rakkude kultiveerimine	24
2.2.3. RSP ja plasmidi nanokompleksi moodustamine	25
2.2.4. Rakkude transfekteerimine.....	25
2.2.5. Peptiidide transfektsiooniefektiivsuse hindamine	26
2.2.6. Nanokompleksi stabiilsuse hindamine	26
2.2.7. Tsütotoksilisuse hindamine	27
2.3. Tulemused ja arutelu	28
2.3.1. Peptiidide süntees ja nanokomplekside moodustamine	28
2.3.2. Nanokomplekside iseloomustus	29
2.3.3. Transfektsiooniline efektiivsus.....	32
2.3.4. Peptiidide ja nanokomplekside toksilisus	33
Kokkuvõte	35
Summary	36
Kasutatud kirjandus	37

Kasutatud lühendid

ACN	atseetonitril
BBB	<i>blood- brain barrier</i> , vere- aju barjäär
CHCA	α -tsüaano-4-hüdroksükaneel hape
CR	<i>charge ratio</i> , laengusuhe
CPP	<i>cell- penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid
DCM	diklorometaan
DIEA	N, N-diisopropüületüülamiin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	N, N-dimetüülformamiid
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
HBTU	N-[1H-Bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat
HeLa	inimese emakakaelavähi rakud
HF	vesinikfluoriidhape
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
LF2000	kommertsiaalne transfektsiooniagent <i>LipofectamineTM 2000</i>
MALDI-TOF MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> , maatriks abistatud laserdesorptsioonionisatsioonlennua ja massispektromeetria
MAP	mudel amfipaatne peptiid
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiin
NF	NickFect perekonda kuuluvad rakku sisenevad peptiidid
ON	oligonukleotiid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
pDNA	<i>plasmid DNA</i> , plasmiidne DNA
PF	PeptFect perekonda kuuluvad rakku sisenevad peptiidid
pGL3	lutsiferaasi ekspresseeriv vektorplasmiid
PrP	<i>prion protein</i> , priioni valk
RLU	<i>relative luminescence unit</i> , suhteline luminesents ühik
RP- HPLC	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i> , pöördfaas vedelikkromatograafia

RSP	rakku sisenev peptiid
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , kaheahelaline lühike geene vaigistav RNA
SKO	splaissigut korrigeeriv oligonukleotiid
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> , tahke faasi peptiidisüntees
TAE	<i>tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid</i>
TAT	HIV-i transkriptsiooni transaktiveeriv valk
t-Boc	tert-butüüloksükarbonüül rühm
t-Bu	tert-butüül rühm
TFA	trifluoroatseethape
TIS	triisopropüülsilaan
TP10	Transportan 10
UV	ultraviolet
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulaarse endoteeli kasvufaktor

Sissejuhatus

Paljud bioloogilistelt aktiivsed ühendid, näiteks peptiidid, valgud ning nukleiinhapped on võimelised ravima erinevaid haigusseisundeid geneetilisel tasemel. Terapeutilise efekti avaldamiseks tuleb neil jõuda raku tsütoplasmasse, tuuma või mõnda konkreetsesse organelli. Kahjuks pole need makromolekulid võimelised suure molekulmassi ning hüdrofoobse loomuse tõttu läbima raku plasmamembraani. Seetõttu on hakatud tähelepanu pöörama viiruslike ja mitteviiruslike transportmehhanismide väljatöötamisele.

Üheks perspektiivikamaks strateegiaks on rakku sisenevad peptiidid (RSP-d), mida on rakendatud edukalt mitmesuguste biomolekulide, näiteks plasmiidse DNA (pDNA), oligonukleotiidide, kaheaahelaliste lühikeste geene vaigistavate RNA-de (siRNA), valkude ja peptiidide transportimisel rakku nii *in vitro* kui *in vivo*. (Morris *et al.*, 2008) Esimest rakku sisenevat peptiidi kirjeldati 1994. aastal ning tänaseks on identifitseeritud erinevaid looduslikke, sünteetilisi ning kimäärseid järjestusi, mis on võimelised tungima rakku ning viima sinna mitmesuguseid ühendeid. (Lindgren ja Langel, 2011)

RSP-de kasutamist limiteerivaks etapiks on peptiidi ja lastmolekuli kinnijäämine endosoomidesse ja teatav tsütotoksiline efekt rakkudele (El-Andaloussi *et al.*, 2007). Seetõttu on hakatud modifitseerima juba olemasolevaid RSP-sid. Saadud on veelgi efektiivsemad transportvektoreid, mis on rakkudele ohutud ning tagavad peptiidide kõrge transfektsioonilise aktiivsuse. Ühe enim uuritud RSP-le, kimäärsele Transportan 10-nele lisati setearoüülrühm ning saadi PepFect3, mis oli võimeline moodustama lastmolekuliga stabiilsemaid nanokomplekse ning vabanema endosoomidest. (Lehto *et al.*, 2011) Selle peptiidi põhjal on disainitud efektiivsemad, NickFect (NF) perekonda kuuluvad RSP-d. NF 1 ja NF 2 on edukalt viinud rakku oligonukleotiide (Oskolkov *et al.*, 2011) ning NF 51 on veelgi efektiivsem transfektsiooniagent pDNA transportimisel. NF 51 kipub moodustama lastmolekulidega liiga stabiilseid nanokomplekse, mis ei luba transporditaval ühendil rakus piisava efektiivsusega vabaneda. (Arukuusk *et al.*, 2013)

Antud töö eesmärgiks on sünteesida tahke faasi peptiidisünteesi (SPPS) meetodil uued NF 51 analoogid N 55 ja NF 56, et uurida nende efektiivsust pDNA transportimisel rakku. Disainitud peptiidid erinevad teineteisest summaarse positiivse laengu poolest ning järjestuste modifikatsioonide tegemisel on aluseks võetud α -heeliksi struktuur, mida RSP-d plasmamembraaniga interakteerudes moodustavad (Ziegler, 2008). Eesmärgiks on uurida, kuidas mõjutab positiivsete laengute arv ja paiknemine peptiidijärjestuses RSP transfektsiooniefektiivsust ning nanokomplekside moodustamise võimet. Antud uurimustöö viiakse läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Ravimite transport rakku

Inimeste ravis on üheks keskseks probleemiks õige koguse bioloogiliselt aktiivse ühendi transportimine spetsiifilistesse kudedesse või rakkudesse. Tänapäeval leiavad oma rakumembraani läbivate omaduste tõttu laialdaselt kasutamist väikestel molekulidel põhinevad ravimid, millel on aga teatud puudujääke. (Brasseur ja Divita, 2010) Esiteks, ei oma sellised ravimid rakuspetsiifilisust. Toimeaine ei jõua sihtkohta piisava efektiivsusega ning hajub kehas ebaühtlaselt ja juhuslikult, mistõttu tuleb ravimit manustada kõrgel kontsentratsioonil. Teiseks võib suur doos olla patsiendile toksiline ning tekitada soovimatuid kõrvalnähtusid. Osa organismi jõudnud ravimist võib ladestuda varukudedes ning põhjustada pikaajalisi komplikatsioone. (Hu, 2005)

Need puudused on pannud aluse suurematel molekulidel, näiteks valkudel, peptiididel ja nukleiinhapetel (DNA, RNA) põhinevate terapeutikumide loomisele, mis võimaldavad ravida erinevaid haiguseid geneetilisel tasandil. (Heitz *et al.*, 2009) Peptiididel põhinevate ravimite osakaal on viimastel aastatel kasvanud. 2001. aastal küündisid nelja peptiidiravimi globaalsed kogumüügisummad üle 1 miljardi USA dollari (Milletti, 2012). Aasta hiljem said USAs turuloo kuus peptiididel põhinevat ravimit ja kaksteist järgmist on jõudnud hetkel viimase faasi kliinilistesse uuringutesse. Seda on rohkem kui eelnevatel aastatel. (Kaspar ja Reichert, 2013)

Kahjuks on aga enamike suurte molekulide praktiline rakendamine inimeste ravis raskendatud just nende ühendite füüsikalis-keemiliste omaduste tõttu. Selleks, et need saaksid avaldada organismis soovitud pikaajalist terapeutilist efekti, tuleb toimeainel ületada mitmeid bioloogilisi barjääre. Esiteks, peavad toimeained jõudma rakkude tsütoplasmasse, tuuma või kindlasse organelli. Plasmamembraani lipiidne kaksikkiht takistab aga suurte ja laenguga molekulide sisenemist rakku. Lisaks tuleb toimeainetel mitmeid membraane läbides säilitada oma bioloogiline aktiivsus. Teiseks, isegi kui need molekulid suudavad läbida rakumembraani, jäävad nad suure tõenäosusega kinni endosoomidesse, kus nad lüesosüümide toimel lagundatakse ning transporditakse rakust välja. (Gupta *et al.*, 2005) Valkude, peptiidide ja nukleiinhapete ravipotentsiaali realiseerimiseks on hakatud tähelepanu pöörama erinevate mitteviiruslikel ja viirusvektoritel põhinevate transportmeetodite väljatöötamisele. Hoolimata sellest, et mõlemas valdkonnas on arvukaid edulugusid, leidub siiski kasutamist piiravaid puuduseid, mida pole veel piisavalt hästi suudetud ületada.

Viirusvektorid. Nukleiinhapetel põhinevate ravimeetodite puhul kasutatakse traditsiooniliselt viirustel põhinevaid strateegiaid. (Zorko ja Langel, 2005) Viirusvektorid vahendavad geenide ülekannet kõrge efektiivsusega ning tagavad pikaajalise geeniekspressiooni. (Gao *et al.*, 2007) Siiski on viirusvektoritel mitmeid puudujääke. Esiteks on neid raske toota ja teiseks pole neid võimalik korduvalt manustada, sest nad võivad põhjustada ägedat põletikku ning tugevaid immuunreaktsioone. Lisaks on problemaatiliseks osutunud insertiooniline mutagenees sihtmärk organismis. (Al-Dosari ja Gao, 2009) Viirvektorite kõrvalnähud võivad osutada organismile fataalseks (Hollon, 2000) ja seetõttu on hakatud otsima alternatiivseid lahendusi mitteviiruslike meetodite seast.

Mitteviiruslikud strateegiad. Alternatiivsed ja ohutumad süsteemid kasutavad sünteetilisi ning looduslikke ühendeid makromolekulide transportimiseks rakku. Mitte viiruslikud transportvektorid on üldjoontes vähem toksilised ning ei põhjusta ägedat immuunvastust. Neid on lihtsam toota ning ravimit on võimalik korduvalt manustada. (Al-Dosari ja Gao, 2009) Siiski on neil meetoditel omad puudused, näiteks füüsilised meetodid nagu elektroporatsioon, mikrosüst ja geenipüss on oma olemuselt invasiivse loomuga ning võivad kahjustada rakumembraane pöördumatult (Gupta *et al.*, 2005). Lisaks seab nende meetodite kasutamiseks teatud piiranguid kõrge hind ja spetsiaalse aparatuuri olemasolu vajadus (Mehier-Humbert ja Guy, 2005). Keemilised meetodid nagu katioonsed lipiidid ja peptiidid ning polümeerid töötavad hästi küll *in vitro* kuid ei sobi kasutamiseks *in vivo*, sest omavad madalat transfektsioonilist efektiivsust ja võivad kutsuda esile teatava immuunvastuse. (Glover *et al.*, 2005)

Mitteviirustel põhinevate meetodite suurimad takistused on puudulik raku- ja koespetsiifilisus ning ühendite transport väikesesse hulka rakkudesse. (Zorko ja Langel, 2005) Keemilistel ühenditel põhinevad mehhanismid on aga tänini kasutuses olevatest meetoditest ühed ohutumad, sest nad ei põhjusta sihtmärkorganismi DNA-s soovimatuid mutatsioone. Siia alla kuuluvad ühtlasi rakku sisenevatel peptiididel (RSP) põhinevad strateegiad, mis on osutunud potentsiaalseks mehhanismiks ületama tänapäeva ravimitööstuse kitsaskohti. Efektne ravim peab olema võimeline toimima mitmesugustes rakuliinides, vabanema endosoomidest ning jõudma sihtmärk organellini. Lisaks peab ravimil olema madal toksilisus ja bioloogiline aktiivsus madalate dooside juures. (Heitz *et al.*, 2009) Neid omadusi ei leia aga tihti peale bioloogiliselt aktiivses ühendis *per se* (Hu, 2005) ja seetõttu on vaja kasutada transportvektorite abi. RSP-d vastavad kõikidele Heitzi poolt kirjeldatud kriteeriumitele. RSP-de puhul on demonstreeritud kõrget transfektsioonilist aktiivsust *in vitro*, rakendamisvõimalusi erinevate rakkuliinide puhul, madalat toksilisust ning nende kasutamiseks pole vaja keerulist tehnoloogiat (Vasconcelos *et al.*, 2013).

1.2. Rakku sisenevad peptiidid

Valkude transduktsiooni rakkudesse kirjeldati esmakordselt 1988. aastal paralleelselt kahe erineva uurimisgrupi poolt (Frankel ja Pabo, 1988; Green ja Loewenstein, 1988), kes demonstreerisid, et HIV-i transkriptsiooni transaktiveeriv valk TAT on võimeline läbima rakumembraane ning sisenema rakkudesse *in vitro*. 1991. aastal jõudis Prochiantzi grupp sarnasele järeldusele, kui nad avastasid närvirakkudesse siseneva 60 aminohappe pikkuse äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) *antennapedia* homeodomääni (Joliot *et al.*, 1991). Sellest homeodomäänist eraldati kolm aastat hiljem esimene RSP, milleks oli 16-st aminohappest koosnev *pAntennapedia* ning mida tuntakse tänapäeval paremini Penetratiini (RQIKIYFQNRMRMKWKK) nime all (Derossi *et al.*, 1994). Samal aastal demonstreeriti, et TAT-iga on võimalik keemiliselt siduda erinevaid makromolekule, misjärel suudab TAT neid transportida kõikidesse imetaja koetüüpidesse ja organitesse (Fawell *et al.*, 1994). Õige pea identifitseeriti TAT-i minimaalne järjestus (⁴⁷YGRKKRRQRRR⁵⁷), mis on vajalik valgul rakku sisenemiseks (Vives *et al.*, 1997). See avastus tegi võimalikuks RSP-de disainimise ning juba samal aastal loodi esimene RSP nukleiinhapete transportimiseks (Morris *et al.*, 1997). Aasta hiljem loodi Langeli grupi poolt kimäärne peptiid Transportan (Pooga *et al.*, 1998a).

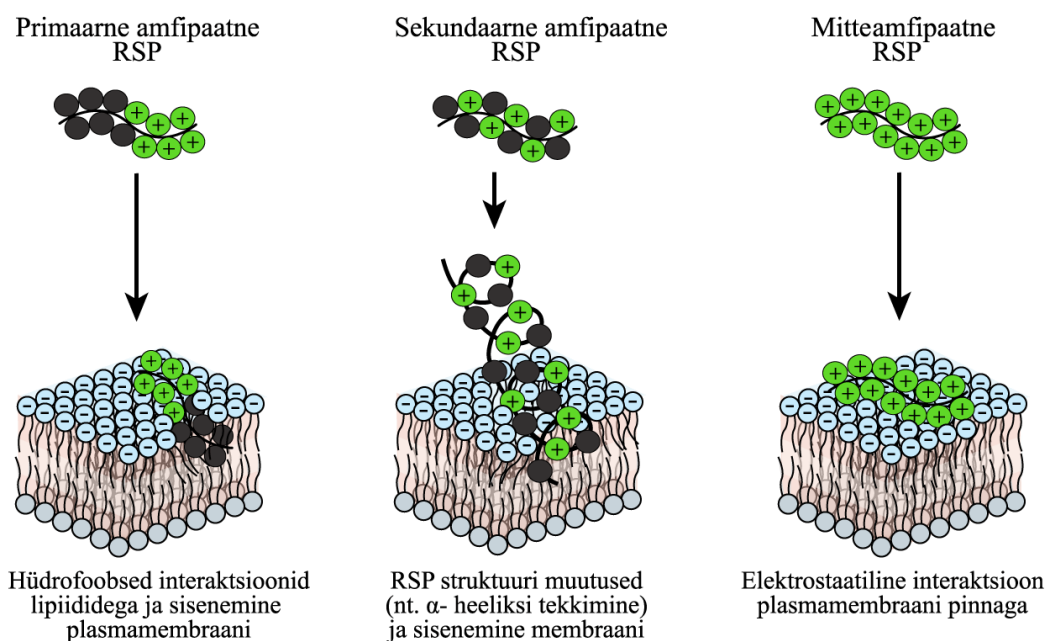
Üldiselt loetakse RSP-deks lühikesi peptiide, mis koosnevad 5. kuni 40. aminohappest, mis on võimelised tungima rakku mitmete erinevate mehhanismide, k.a. endotsütoosi abil. Lisaks suudavad RSP-d transportida rakku nendega kovalentselt või mittekovalentselt seotud bioaktiivseid ühendeid. (Langel, 2011) Suurem osa tänaseni uuritud RSP-dest koosnevad füsioloogilise pH juures 17% kui 100% ulatuses positiivselt laetud aminohapetest. On teada, et negatiivse kõrvalahelaga aminohapped RSP-de koosseisus ei takista peptiidi rakku tungimist. (Zorko ja Langel, 2005)

RSP-sid hakati nägema potentsiaalsete ravimikandjatena siis, kui teadusmaailma jõudsid esimesed edusammud RSP-de rakendamise kohta *in vivo*. Dowdy uurimisgrupp demonstreeris 1999. aastal väikeste peptiidide ja suurte valkude transporti läbi vere- aju barjääri (*blood- brain barrier*, BBB) pärast hiire kõhukelmesisest süsti (Schwarze *et al.*, 1999). Uute RSP-de avastamine, olemasolevate modifitseerimine ja sünteetiliste disainimine viis mitmete järgmiste RSP-de, nagu herpes viiruse struktuurse valgu VP22 (Elliott ja O'Hare, 1997), Transportani (Pooga *et al.*, 1998a), mudel amfipaatse peptiidi (MAP) (Oehlke *et al.*, 1998), signaaljärjestustel põhinevate peptiidide (Lindgren *et al.*, 2000), oligoarginiini (Wender *et al.*, 2000) ja sünteetilise arginiiniga rikastatud peptiidide (Futaki *et al.*, 2001) kirjeldamiseni. Viimase 20. aasta jooksul on kirjeldatud enam kui 100 peptiidijärjestust (pikkusevahemikus 5 kuni 40 aminohapet), mis on võimelised läbima plasmamembraani ning

transportima erinevaid ühendeid rakku (Koren ja Torchilin, 2012). Tänapäeval on enim uuritud RSP-d TAT, Transportan ja Penetratiin (Järver ja Langel, 2004).

RSP-sid saab klassifitseerida mitmete tunnuste alusel ning kokkuleppelist ühtset süsteemi ei leidu. Üks lihtsamaid võimalusi on liigitada RSP-sid nende päritolu järgi: looduslikest valkudest saadud (Penetratiin, TAT), kimäärsed (Transportan) ja sünteetilised (MAP) RSP-d. Kimäärsed peptiidid koosnevad nii looduses esinevatest kui ka sünteetilisest järjestustest samas, kui sünteetilised RSP-d on täielikult tehnikult disainitud. (Lindgren ja Langel, 2011)

Lisaks võib RSP-sid klassifitseerida füüsikalise-keemiliste omaduste põhjal, võttes seejuures arvesse peptiidi aminohappelise järjestuse ja plasmamembraaniga seostumise omadusi. Selle alusel jaotuvad RSP-d kolme klassi: primaarsed amfipaatid, sekundaarsed amfipaatid ja mitteamfipaatid (Joonis 1). Primaarsed amfipaatid RSP-d (nt. Transportan) on enam kui 20 aminohappe pikkused peptiidid. Nende primaarstruktuur koosneb jadamisi paiknevatest hüdrofoobsetest ja –fiilsetest järjestustest. Sellised RSP kasutavad plasmamembraani sisenemiseks otsest transduktsiooni ja ulatuvad seeläbi sügavamale membraani hüdrofoobsesse ossa kui teised RSP-d. Primaarsed amfipaatid seonduvad tugeva afiinsusega plasmamembraanis asetsevate neutraalsete kui ka anioonsete lipiididega ning seetõttu arvatakse, et seondumine toimub hüdrofoobsete interaktsioonide kaudu.



Joonis 1: Primaarsete, sekundaarsete ja mitte amfipaatsete RSP-de ning rakumembraani fosfolipiidse kaksikkihi vahelised interaktsioonid. ● – positiivselt laetud aminohape. (Ziegler, 2008)

Sekundaarsete amfipaatsete RSP-de (nt. Penetratiin) eripäraks on minna membraanilipiididega interakteerudes üle sekundaarstruktuurilistesse (α -heeliks või β -leht) konformatsioonidesse. Need peptiidid koosnevad vaheldumisi hüdrofoobsetest ja

katioonsetest aminohapetest ning on afiinsemad anioonsete lipiidide suhtes. Mitteamfipaatsed (TAT) on kõige lühemad RSP-d ning sisaldavad suurel hulgal katioonseid aminohappeid (nt. arginiin) ning seetõttu seostuvad tugevalt membraani anioonsete lipiididega. (Ziegler, 2008)

Kolmas võimalus on klassifitseerida RSP-d summaarse laengu alusel katioonseteks, amfipaatsseteks ja hüdrofoobseteks peptiidideks (Milletti, 2012). Mõned autorid on klassifitseerinud RSP-d transporditava ühendiga loodud sideme iseloomu alusel kas kovalentselt või mittekovalentselt seondatavateks peptiidideks (Vasconcelos *et al.*, 2013). Alternatiivselt võib RSP-sid jaotada arginiinirikasteks ja amfipaatsseteks peptiidideks (Shin *et al.*, 2014) või hoopis lahterdada struktuursete tunnuste alusel (Langel, 2011). Hetkel ei leidu ühtset klassifitseerimise süsteemi ning iga autor kasutab seda, mida enda kontekstis sobivaimaks peab.

1.2.1. Transportanist NickFectideni

Kimäärne 27. aminohappest koosnev Transportan töötati välja 1998. aastal Langeli grupi poolt, kui neuropeptiid galaniini aminotermiinusest saadud 12-nele funktsionaalsele aminohappele liideti lüsiini abil vapsiku toksiidse valgu mastoprani karboksüülterminuse 14 aminohapet (Pooga *et al.*, 1998a). Leiti, et Transportan siseneb paljudesse imetaja rakuliinidesse efektiivselt ning 15 minutit pärast rakkude transdukteerimist oli võimalik fikseerida peptiidi kõrge kontsentratsioon tuumamembraanil. Transportaniga on transporditud keskmise suurusega hüdrofiilseid molekule (näiteks peptiide, oligonukleotiide). (Pooga *et al.*, 1998b) Transportani N-terminuse esimese 6 aminohappe eemaldamise teel on saadud Transportan 10 (TP 10). Erinevalt Transportanist, ei mõjuta TP 10 GTPaaside aktiivsust isegi kõrgetel kontsentratsioonidel ning ta ei ole ligandiks galaniini retseptoritele. (Soomets *et al.*, 2000)

TP 10 baasil on disainitud nn. teise põlvkonna RSP-d eesmärgiga parendada nukleiinhapete internalisatsiooni rakku ning nende vabanemist endosoomidest. Stearüülühma lisamine TP 10 N-terminaalsesse otsa muutis TP 10 veelgi efektiivsemaks transportvektoriks. (Mäe *et al.*, 2009b) Stearüül-TP 10-ga, mis kannab nime PepFect 3 (PF3) (Andaloussi *et al.*, 2011a) on transporditud erineva suurusega plasmide tervesse raku populatsiooni *in vitro* ning see RSP on oma loomult madala toksilisusega. Arvatakse, et PF 3 on efektiivne just seetõttu, et ta moodustab plasmiidiga stabiilseid nanokomplekse. Hoolimata sellest, et PF3 suudab endosoomidest vabaneda, ei tee ta seda piisava efektiivsusega. (Lehto *et al.*, 2011) Seetõttu seostati PF 3-ga kovalentselt trifluorometüülkinoliini (*trifluoromethylquinoline*) derivaat ja saadi PepFect 6 (PF 6), mis on võimeline tänu

endosoomide hapustumisele ja osmootsele paisumisele lastmolekule vabastama. (Andaloussi *et al.*, 2011b)

Võttes aluseks PF 3, on töötatud välja nn. kolmanda põlvkonna peptiidid NickFectid (NF-id). PF 3 kaheksandas positsioonis olev isoleutsiin (Ile8) asendati hüdrofoobsema treoniiniga (Thr) ning järjestusse lisati fosfaatrühm kolmandasse (Tyr3) või kaheksandasse (Thr8) positsiooni. Vastavalt saadud NickFect 1 (NF 1) ja NickFect 2 (NF 2) olid hüdrofiilsemad, väiksema laenguga ja pH sõltuvad. Võrreldes PF 3-ga, avaldasid mõlemad peptiidid oligonukleotiidide transpordil rakku suuremat efekti splaissingu korrektsiooni puhul. (Oskolkov *et al.*, 2011)

PF 3-e edasisel modifitseerimisel on loodud NF-ide perekonda kuuluv NF 51. Stearüül-TP 10 seitsmendas positsioonis asetsev lüsiin, mis ühendab galaniini jääki mastoprani jäägiga, asendati ornitiiniga, kusjuures kuuendas positsioonis olev glütsiin liideti ornitiini (Orn) kõrvalahela aminorühmaga (γ -NH₂). Vastavad modifikatsioonid tehti selleks, et parendada PF 3-e transfektsiooniomadusi ning nanokompleksi stabiilsust. NF 51 transportis plasmiidse DNA (pDNA), oligonukleotiidid ja siRNA peaaegu tervesse rakupopulatsiooni kõrge efektiivsusega. Rakupopulatsiooniülene geenide vaigistamine saavutati 48h tunni möödudes pärast rakkude transfekkeerimist. NF 51 puhul ei täheldatud kõrgendatud toksilisust. Katsed NF 51-ga lubavad arvata, et peptiidi saab kasutada erinevatel otstarvetel sh. geeniteraapias ja rekombinantsete valkude tootmises. (Arukuusk *et al.*, 2013) Mõned näited RSP-de peptiidijärjestustest on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Näiteid erinevatest RSP-de järjestustest

Peptiid	Järjestus	Viide
Penetratiin	RQIKIYFQNRMRKWKK- NH ₂	(Derossi <i>et al.</i> , 1994)
Transportan	GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	(Pooga <i>et al.</i> , 1998a)
Transportan 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	(Soomets <i>et al.</i> , 2000)
NickFect 1	AGY(PO ₃)LLGKTNLKALAALAKKIL- NH ₂	(Oskolkov <i>et al.</i> , 2011)
NickFect 2	AGYLLGKT(PO ₃)NLKALAALAKKIL- NH ₂	
NickFect 51	AGYLLGOINLKALAALAKKIL- NH ₂	(Arukuusk <i>et al.</i> , 2013)

1.2.2. RSP-de modifitseerimine

Hoolimata sellest, et RSP-sid on laialdaselt uuritud, on kiiniliste katsete faasi jõudnud mõned üksikud (Heitz *et al.*, 2009). RSP-d on küll potentsiaalsed kandidaadid makromolekulide transportimiseks rakku, kuid veenvaid uuringuid mõistmaks nende sisenemismehhanisme pole läbi viidud. (Jones, 2008). Kuigi RSP-de sisenemismehhanism on tänaseni vaidluse all, on enamik teadlasi jõudnud järeldustele, et RSP-d, mis on seotud

lastmolekulidega, sisenevad rakku endotsütoosi vahendusel. Seetõttu piirab RSP-de edukat kasutamist peptiidi ja toimeaine kompleksi kinnijäämine endosoomaalsest vesiikulitesse. (Lee *et al.*, 2013) RSP-de kinnijäämine endosoomidesse suurendab tõenäosust, et peptiid lagundatakse lüsoosüümide poolt ning aktiivne ühend ei jõua soovitud sihtmärgini (Lundin *et al.*, 2008). Selleks, et RSP-sid saaks inimeste ravis efektiivsemalt kasutada, peavad peptiidid endosoomidest vabanema ning transportima toimeaine edukalt tsütosooli, raku tuumani või organellini, kus bioaktiivne lastmolekul saaks avaldada soovitud toimet. Selle probleemi ületamiseks on tänaseks loodud mitmeid erinevaid RSP-de modifitseerimise strateegiaid.

Üheks neist on RSP-de sidumine viiruste valkudest eraldatud peptiidjärjestusega, mis aitavad looduses patogeenil endosoomidest vabaneda ja organismi nakatada (Bolhassani, 2011). Näiteks on influenza viiruse *haemagglutiniini* valgust eraldatud peptiid HA2 RSP-dega konjugeeritult demonstreerinud *in vitro* tingimustes fusioogenset aktiivsust ja aidanud kompleksil endosoomist vabaneda (Wadia *et al.*, 2004).

Lisaks on osutunud edukaks RSP-de hüdrofoobsed modifikatsioonid ja peptiididele rasvhappe jääkide lisamine (Mäe *et al.*, 2009a). *In vitro* tingimustes on üheks praktilisemaks tehnikaks osutunud stearoüülrühma lisamine RSP-le. Näiteks PF 3-e puhul on demonstreerinud peptiid-toimeaine nanokompleksi kõrgemat transfektsioonilist aktiivsust tänu paremale endosoomidest vabanemisele. (Lehto *et al.*, 2011)

Kolmas võimalus on RSP-d rikastada histidiiniga. Imidasool tsükkel histidiinis protoneerub happelises keskkonnas positiivse laenguni. See omadus põhjustab happelise keskkonnaga endosoomis osmootset paisumist, mis lõpeb endosoomi purunemisega ning toimeaine vabanemisega tsütosooli. (Lo ja Wang, 2008)

Veel üheks väljakutseks on saavutada RSP-dega raku- ning organelli spetsiifilisus. Eriti oluline on rakuspetsiifilisus vähiravis, milleks RSP-sid võiks potentsiaalselt rakendada. RSP-d võimaldaksid luua universaalse ravimikandja, mis oleks võimeline spetsiifiliselt liikuma mitmetesse erinevatesse kasvajatüüpidesse heterogeensetes patsiendipopulatsioonides. Kahjuks sisenevad tänaseni teadaolevalt peptiidid rakkudes mittespetsiifiliselt. (MacEwan ja Chilkoti, 2013) Selle probleemi ületamiseks on identifitseeritud näiteks ainult glioomile spetsiifilisi peptiidjärjestusi (*tumor-homing*), mis on võimelised koos RSP ja toimeainega konjugeeritult suunama peptiidi spetsiifiliselt glioomi rakkudes (Eriste *et al.*, 2013). Edukaks on osutunud RSP-de muutmine rinnavähi spetsiifiliseks, kasutades selleks tsüklilist peptiidi PEGA (Myrberg *et al.*, 2007).

Terapeutilises praktikas on oluline ravimite organelli spetsiifilisus. Kuigi enamik RSP-sid on võimelised tungima rakutuuma või tsütoplasmasse, pole pööratud piisavalt tähelepanu RSP-de võimele tungida spetsiifilistesse organellidesse. RSP-del oleks aga veelgi suurem

bioloogiline ja meditsiiniline rakendusvõimalus, kui nad suudaksid lokaliseeruda vastavatesse organellidesse. (Fonseca *et al.*, 2009) Selline RSP-de omadus aitaks ravida organelli põhiseid haiguseid molekulaarsel tasandil. Näiteks on Kelley grupp loonud katioonsed lipofiilsed RSP-d, mis on võimelised lokaliseeruma spetsiifiliselt mitokondrisse (Horton *et al.*, 2008). See aitaks potentsiaalselt tõrjuda haiguseid, mille ravi eelduseks on juurdepääs mitokondrisse. Raku- ja koespetsiifilisus lubaks ravimeid manustada võimalikult madalatel efektiivsetel kontsentratsioonidel ning vähendada patsientidel soovimatute kõrvalnähtude esinemist.

1.3. RSP-de rakendamise võimalused inimeste ravis

RSP-d on mitmekülgsed transportvektorid, millega on võimalik viia erinevaid ühendeid rakkudesse. See muudab RSP-d perspektiivikaks mitmesuguste haiguste ravis ning võimalused võivad olla piiramatud. Ainuüksi 2012 aastal keskendusid RSP-de uuringud nende rakendamisele antimikroobses ravist kuni antineoplastilise teraapiani. (Vasconcelos *et al.*, 2013) RSP-de ja toimeaine konjugaatide prekliinilised ning kliinilised katsed on osutunud paljulubavaks vähi, kardiovaskulaarsete haiguste ravis, insuldi ennetamises ja valu leevendamises. (Johnson *et al.*, 2011) RSP-d on olnud edukad nii kemoterapias rakendatavate ravimite kui pro-apoptootiliste valkude transportimisel rakku. Apoptoosi inhibeerimine RSP-de abil võib olla efektiivne neurodegeneratiivsete haiguste, vähi ja isheemiatõve ravis. Ühtlasi võivad RSP-d osutada kasulikuks allergiate ning astma ravis ja bakteriaalse sepsise ületamises. Peptiidide rakendamine antigeenide transpordis intratsellulaarselt võimaldaks parendada vaktsiinide efektiivsust. Lisaks suudavad RSP-d vahendada kontrastainete transporti läbi BBB, sihtmärgipärast radioaktiivselt märgistatud antikehade transporti rakku ja viirusinfektsioonide visualiseerimist reaajas. (Fonseca *et al.*, 2009)

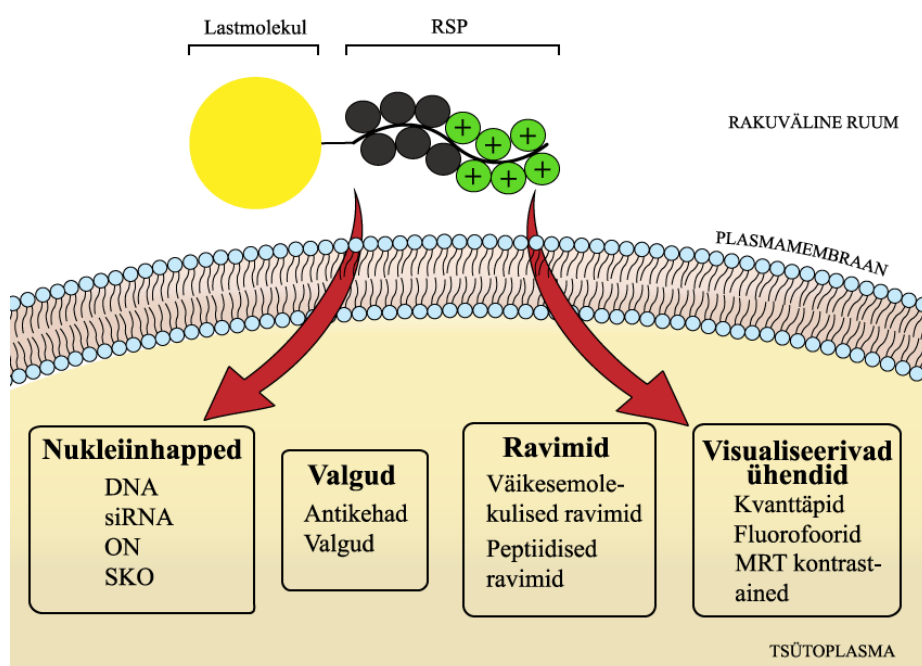
Osad RSP-de uuringud on osutunud edukaks ravimite absorptsiooni efektiivsuse tõstmisel inimese seedekulglas. Näiteks, on RSP-ga seotud insuliin paremini organismi poolt omastatav, kui insuliin iseseisvalt. RSP-ga mittekovalentselt seotud insuliin on võimeline säilitama enda bioloogilist aktiivsust ning vähendama vere glükoositaset. (Kamei *et al.*, 2008) RSP-sid on võimalik rakendada bioaktiivsete ühendite transpordil läbi seedekulgla nii, et toimeaine säilitaks bioloogilise aktiivsuse.

RSP-de mitmekülgsust demonstreerib see, et peptiid võib omada ise terapeutilist efekti. Näiteks, tekitab Prioni tõve valesi kokku pakitud priioni valk (PrP^{SC}). Selle valgu normaalsest isoformist (PrP^C) eraldi 28 aminohappe pikkune lõik, millel on RSP tunnused. See peptiid sisaldas regiooni, mis on võimeline takistama PrP^C konversiooni PrP^{SC}-ks.

(Löfgren *et al.*, 2008) Selle PrP^C – RSP konjugaadi õigesti kasutamine võib osutuda tulemlikuks Prioni tõve ravis.

1.3.1. Ühendite transport RSP-dega

RSP-dega on rakkudesse transporditud mitmesuguseid erinevaid ühendeid: alates väikestest terapeutikumidest ja siRNA-st lõpetades mitmesuguste makromolekulidega (Vasconcelos *et al.*, 2013) (Joonis 2). RSP-dega on edukat *in vitro* ja *in vivo* transporditud valke, antikehasid, nukleiinhappeid, fluorokroome, nanopartikleid, lipiididel põhinevaid ühendeid, kvanttäppe, kontrastaineid magnetresonantsiks ning ravimeid. (Koren ja Torchilin, 2012)



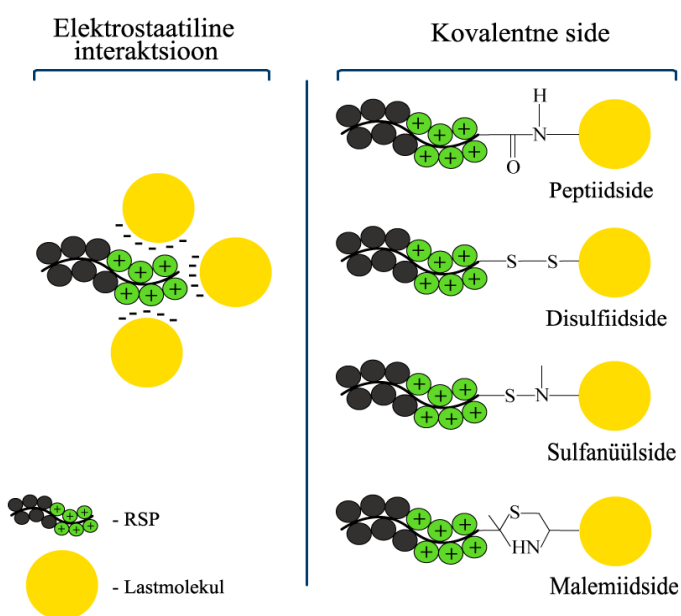
Joonis 2. Mõningad näited ühenditest, mida on võimalik RSP-dega rakkudesse transportida. (Stewart *et al.*, 2008)

Esiteks, saab RSP-dega transportida bioaktiivseid makromolekule. RSP-dega seotud peptiide on edukalt viidud rakkudesse ja mõjutatud seeläbi sealseid valk-valk või valk-oligonukleotiidi interaktsioone. Lisaks saab RSP-dega transportida valke, mis muidu rakumembraani ei läbi. Selle juures on oluline, et RSP ja valgu kompleks ei jääks kinni endosoomidesse või vabaneks sealt enne, kui transporditav valk lagundatakse. Edukalt transporditud valkude abil on võimalik reguleerida rakus geeniekspressiooni. (Järver ja Langel, 2004) RSP-d on olnud efektiivsed alates 30 kDa kuni 150 kDa valkude transportimisel (Stewart *et al.*, 2008). Näiteks on edukalt transporditud TATi abil 120 kDa suurust β -galaktosidaasi valku kõikidesse hiire kudedesse, kusjuures transporditav valk ületas BBB ja säilitas bioloogilise aktiivsuse. (Schwarze, 1999) Veel saab RSP-dega siduda nukleiinhappeid. Näiteks transportida geeniekspressiooni vaigistamiseks *antisens*

oligonukelotiide (ON) või muidu rakkude poolt raskesti vastuvõetavat siRNA-d. Kõige suurema ravipotentsiaaliga on RSP-de rakendamine geneetilise materjali transportimisel, mis pakub alternatiivi viirusvektoritel põhinevale geeniteraapiale. (Järver ja Langel, 2004)

Teiseks, võib RSP-dega transportida erinevaid rakkude visualiseerimiseks kasutatavaid ühendeid ja biosensoreid. Varasemalt on edukalt tõestatud kvanttäppide transportimist TAT-iga läbi BBB-i ning monoklonaalsete antikehade transporti radioimmunoteraapias kasutamiseks. RSP-sid saab ühtlasi kasutada fluorestseeruvate biosensorite transportimiseks rakku. Näiteks, rakusisese tsingikoguse detekteerimiseks mõeldud fluorestseeruvat biosensorit on viidud edukalt rakku just RSP-de abil. (Fonseca *et al.*, 2009)

Transporditavaid ühendeid on võimalik RSP-dega siduda kas kovalentselt või mittekovalentselt (Joonis 3).



Joonis 3: Lastmolekuli saab RSP-ga siduda kovalentselt või elektrostaatilisel. (Koren and Torchilin, 2012)

Kovalentse sideme puhul on tavaliselt transporditav ühend seotud RSP-ga disulfiid või tio-ester sidemega, mis on stabiilsed kuid kergesti lagundatavad. Sellel meetod võib muuta transporditava ühendi bioloogilist aktiivsust ning ühe RSP-ga on võimalik siduda ainult üks transporditava ühendi molekul. Lisaks nõuab lastmolekuli kovalentne sidumine RSP-dega tihti keerukat ja tömahukat sünteesiprotsessi.

Seetõttu on hakatud kasutama

mittekovalentset strateegiat. (Heitz *et al.*, 2009), sest see lihtsustab oluliselt konjugeerimise protsessi. Üksnes RSP ja transporditava lastmolekuli omavahelisel segunemisel on võimalik moodustada nanokompleks elektrostaatiliste interaktsioonide vahendusel. Kaob vajadus keeruliste sünteesiprotsesside järele. Lisaks säilib sellisel meetodil peptiidiga seotud ühendi bioloogiline aktiivsus ja ühe RSP-ga on võimalik siduda mitu lastmolekuli. (Koren ja Torchilin, 2012) Ühtlasi on RSP-d näidanud kõrget transfektsioonilist aktiivsust ka kõige keerulisemate makromolekulide puhul, mis on peptiidiga seotud üksnes mittekovalentselt. (Fonseca *et al.*, 2009)

Lastmolekulide sidumisel RSP-dega on oluline leida optimaalne kompleksi stabiilsus, mis võimaldaks transporditaval ühendil bioloogilisi barjääre läbides vabaneda peptiidi küljest õigel ajal. Lastmolekul ei tohi olla seotud RSP-ga liiga tugevalt ega nõrgalt. Seejuures on oluline, et lastmolekul ei tuleks RSP küljest lahti plasmamembraani läbides, vaid suudaks terapeutilise efekti avaldamiseks vabaneda peptiidi küljest alles sihtmärkrakus. (Viola *et al.*, 2010)

1.3.2. Nukleiinhapete transport RSP-dega

Geeniteraapia üks põhilisi eesmärgi on ravida haiguseid tekitavaid ja normaalseid geenifunktsioone muutvaid mutatsioone. Selleks, et geenimanipulatsioon avaldaks mõju füsioloogiliselt, on vaja toimetada terapeutiliste omadustega geneetiline materjal edukalt raku tuuma. (Glover *et al.*, 2005) Lihtsaim viis selle teostamiseks on kasutada pDNA-d. Terapeutilise efektiga geen inkorporeeritakse plasmidi ning saadud konstruktiga transfekteeritakse soovitud koed või rakud. Kahjuks ei ole nukleiinhapped suure molekulmassi ja negatiivse laengu tõttu võimelised rakumembraane läbima. (Lehto *et al.*, 2011) Seetõttu on vaja kasutada transportvektorite abi. RSP-de võime transportida makromolekule, sh. nukleiinhappeid läbi plasmamembraani on muutnud selle strateegia üheks potentsiaalseks mitteviiurustel põhinevate transportstrateegiate hulgas.

Nukleiinhapped, nagu oligonukleotiidid (ON), kaheaahelaline plasmidne DNA, lühikesed üheaahelised splaissitud korrigeerivad oligonukleotiidid (SKO) ja kaheaahelised lühikesed geene vaigistavad RNA-d (siRNA) omavad geeniteraapias kõrgelt terapeutilist potentsiaali. (Lopez-Fraga *et al.*, 2008) Pärast Divita grupi poolt publitseeritud katset, kus suudeti edukalt viia ON-e imetajate rakkudesse, on RSP-d huvipakkuvad just ON-de transpordis (Morris *et al.*, 1997). Näiteks vaigistab siRNA imetaja rakkudes spetsiifilist mRNA-d ja suudab inhibeerida seeläbi vastava valgu ekspressiooni. Seetõttu on just siRNA vähiravi seisukohalt teadlastele huvipakkuv. siRNA konjugeeritakse valdavalt RSP-ga mitte kovalentselt, sest sel viisil säilitavad mõlemad ühendid bioloogilise aktiivsuse. (Shin *et al.*, 2014) Näiteks on suudetud *in vitro* katsetes siRNAdega inhibeerida vaskulaarse endoteeli kasvufaktori (VEGF) ekspressiooni, mis on oluline vähirakkude jagunemises (Kim *et al.*, 2006). Ühtlasi on RSP-dega rakkudesse edukalt transporditud teisi nukleiinhappeid, näiteks *antisens* ON-e, SKO-e ja pDNA-d (Arukuusk *et al.*, 2013).

1.4. RSP-de sisenemismehhanismid

RSP-de täpne sisenemismehhanism rakkudesse on siiani ebaselge. Ühtset teooriat, kuidas RSP-d rakku sisenevad, ei leidu. Arvatakse, et esmane kontakt RSP ja rakumembraani

vahel toimub proteoglükaanidega moodustunud elektrostaatiliste interaktsioonide vahendusel. (Heitz *et al.*, 2009) Rakumembraaniga seondumisel muutub RSP struktuur ning sekundaarsed amfipaatsed peptiidid lähevad üle sekundaarstruktuuri, näiteks α -heeliksisse. See võimaldab peptiididel tõsta enda vabaenergia taset ning lahutada ahelas asuvad polaarsed aminohapped mittepolaarsetest, et saavutada parem afiinsus rakumembraaniga. RSP-d on võimelised kasutama rakku sisenemiseks nii otsest translokatsiooni kui ka endotsütoosi. Konkreetne internalisatsiooni meetod sõltub RSP tüübist ja kontsentratsioonist, temperatuurist, raku energiatasemest, transportmolekulist ja rakumembraani lipiidsest koostisest. (Ziegler, 2008)

Valdavalt on jõutud arusaamale, et RSP-d, eriti suurte transportmolekulidega konjugeeritult, sisenevad rakku energia sõltuva endotsütoosi abil. (Vasconcelos *et al.*, 2013) Endotsütoos, mis on raku poolt reguleeritud protsess ainete omastamiseks ekstratsellulaarsest maatriksist, jaguneb fagotsütoosiks ja pinotsütoosiks. Fagotsütoosi kasutavad spetsiaalsed rakutüübid nagu makrofaagid ja neutrofiilid, ning see on mõeldud suuremate osakeste internaliseerimiseks. Pinotsütoos esineb seevastu kõikides rakutüüpides, ning selle võib jagada omakorda makropinotsütoosiks, klatriin- ja lipiidsild/kaveoliin- sõltuvaks endotsütoosiks või klatriin ja kaveoliin sõltumatuks endotsütoosiks. Kõik need mehhanismid lõpevad internaliseeritava molekuli kinnijäämisega endosoomi. (Conner ja Schmid, 2003) Seetõttu on oluline leida meetodeid, mis aitavad RSP ja lastmolekuli kompleksil vabaneda vesiikulist enne, kui kompleks heidetakse rakust välja või lagundatakse lüsoosoomides.

Valdavalt määrab selle, millist sisenemismehhanismi RSP-täpselt kasutab, peptiidiga konjugeeritud lastmolekuli suurus. (Maiolo *et al.*, 2005) Näiteks on TAT sisenenud lipiid silla vahendatud endotsütoosi abil, kui ta on konjugeeritud valguga (Fittipaldi *et al.*, 2003) ning klatriin-sõltuva endotsütoosiga, kui ta on konjugeeritud fluorofooriga (Richard *et al.*, 2005).

Hoolimata sellest, et konkreetset RSP-de sisenemismehhanismid on tänaseni vaidluse all, on jõutud järeldusele, et üks RSP võib kasutada rakku sisenemiseks mitut erinevat mehhanismi. Näiteks, katioonne Penetratiin kasutab HeLa rakkudes sisenemiseks võrdväärselt makropinotsütoosi, klatriin-vahendatud ja kaveool vahendatud endotsütoosi. (Duchardt *et al.*, 2007)

1.5. RSP-de toksilisus

RSP-d lagunevad organismis kehaomasteks molekulideks ning on seetõttu suhteliselt madala toksilisusega. Kandjavektoritena omavad RSP-d madalamat immunogeneetilist aktiivsust kui viirustel põhinevad strateegiad. Seetõttu saab RSP-del põhinevaid ravimeid korduvalt administreerida ja kasutada pikaajaliste teraapiate puhul. (Grdisa, 2011) Kahjuks on RSP-de kõrgetel kontsentratsioonidel demonstreeritud nende toksilist mõju rakkudele. (Saar

et al., 2005) Selleks, et RSP-sid saaks kasutada edukalt ravimikandjatena, tuleb nende toksilisus hoida võimalikult madalal tasemel. Kõige rohkem on kirjeldatud RSP-de toksilisust *in vitro* oludes, sest *in vivo* puhul on toksilisuse uurimine keerulisem. RSP-d võivad kahjustada raku- ja organellimembraane ning peptiidid võivad avaldada toksilist mõju rakukomponentidega interakteerudes. (Zorko ja Langel, 2005) Tõenäoliselt tekivad RSP-de sisenemisel rakumembraanis häired, mis viivad tsütoplasma lekkimiseni (Saar *et al.*, 2005). Lisaks võib RSP-de translokeerumine segada plasmamembraanis paiknevate valkude funktsioneerimist ja mõjutada seeläbi rakkude elumust (Lundberg ja Langel, 2003). Näiteks on tsütotoksiliseks osutunud MAP ja Transportan, mille struktuur meenutab lüütilisi antimikroobseid peptiide, mis tapavad mikroobe, lagundades nende rakumembraane. Toksilisus rakkudele võib sõltuda RSP kontsentratsioonist keskkonnas. Erinevates rakuliinides on MAP kontsentratsioonil 1 μM ja Transportan 5 μM omanud pigem tugevat toksilist efekti. Seevastu Penetratiin või TAT omasid kõrgetel kontsentratsioonidel pigem madalamat tsütotoksilist aktiivsust. (Zorko ja Langel, 2005)

Üldiselt tsütotoksilisust RSP-dega ei seostata, sest toksiliseks võivad muutuda kõik ühendid kui nad ületavad teatud kontsentratsiooni piiri. Membraanitoksilisus võib tekkida RSP ja transportmolekuli kompleksi moodustamisel ning seetõttu on vaja läbi viia tsütotoksilisuse kontrolli kõikide praktiliselt rakendust leidvate RSP-de puhul. (Copolovici *et al.*, 2014)

1.6. Tahke faasi peptiidisüntees

Tänapäeval kasutatakse peptiidide sünteesimiseks valdavalt Bruce Merrifieldi poolt loodud tahke kandja sünteesimehhanismi (SPPS). See protsess põhineb ideel, et peptiidahel sünteesitakse pikaks samm-sammu haaval ajal, kui ahel on kovalentselt kinnitatud tahkele kandjale. Nii kandja kui peptiidahel on stabiilses olekus ja reaktsioonis lahustumatud. Seetõttu on võimalik reaktsioonikeskkonda mitmeid kordi pesta ning filtreerida välja üleliigsed reagentid ja kõrvalproduktid. (Merrifield, 1969)

SPPS käigus on esimeseks etapiks C–terminaalse otsaga aminohappe sidumine tahke kandjaga funktsionaallüli ehk *linkeri* vahendusel. Tahkeks kandjaks sobivad stüreen-divenüülbenseeni kopolümeerid, mille diameeter on umbes 50 μm . Kandjale ehk vaigule kinnituvad omakorda funktsionaalsed *linkerid*, mille hulk varieerub 0,5-0,8 mmol/g. Pikemate kui 25 aminohappeliste peptiidide puhul kasutatakse väiksemat vahelülide arvu vaigu kohta 0,1-0,2 mmol/g selleks, et formuleeruv peptiidahel ei takistaks reagentide juurdepääsu. Peptiidahelat sünteesitakse SPPS meetodiga C-terminusest N-terminuse suunas. Vastavalt tahkele kandjale kinnitatud *linkeri* iseloomule, saab peptiidi siduda vaigule läbi ester- või

amiidsideme. Sünteesimisel kasutatakse laialdaselt kandjana 4-metüülbenshüdrüülamiini (MBHA), mille puhul on saadakse lõpp-produktina C-terminaalselt amideeritud peptiid. Reagentide juurdepääsu kandjas olevate vahelülideni võimaldab diklorometaan (DCM), mis paneb vaigu punduma, ja N, N- dimetüülformamiid (DMF) lahust, mis parendab reagentide lahustuvust.

Järgmise sammuna eemaldatakse peptiidahela aminohappelt N^{α} kaitserühm ja aktiveeritakse järgmise seotava aminohappe C^{α} karboksüülrühm. Aktivaatoritena kasutatakse fosfoonium ja uroonium reagente, näiteks DMF-s lahustatud N-[1H-Bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaati (HBTU) ja 1-hüdroksübensotriasooli (HOBt). Reaktsiooni lisatakse tertsiaalset amiini, näiteks N, N-diisopropüületüülamiini (DIEA-d), et kindlustada N-kaitstud aminohappe karboksülaadi reageerimise aktivaatoritega. Aktiveerimiseks vajaminev aeg oleneb aktiveeritavast ainest, olemasolevast peptiidi järjestusest ning reagentide kontsentratsioonist. Peptiidahela aminohappe N-terminus liitub vaba aminohappe C-terminusega peptiidsideme vahendusel ning seeläbi pikeneb vaigu küljes olev ahel. Selle etapi jooksul on kaitstud seotava aminohappe N-terminus ning mõlema aminohappe funktsionaalsed kõrvalrühmad. Seda protsessi korratakse kuni soovitud peptiidahela valmimiseni. Pärast viimase aminohappe sidumist eemaldatakse ajutine kaitserühm. Viimase etapina lõigatakse peptiidi tahkelt kandjalt ja eemaldatakse aminohapete kõrvalahelate püsivad kaitserühmad.

Ajutiste aminohapete kaitserühmade alusel võib SPPS protsessi jaotada kahte rühma Fmoc/t-Bu ja t-Boc/Bzl. Fmoc ja Boc tähistavad N^{α} kaitserühma ning t-BU ja Bzl vastavalt aminohapete kõrvalahelate kaitserühmi. Tert-butüüloksükarbonüül (t-Boc) keemia põhineb happelabiilsetel kõrvalahelate kaitserühmadel. Pärast aminohappe sidumist eemaldatakse t-Boc kaitserühm tugeva trifluoroatseethappega (TFA). Peptiidahela sünteesi lõppedes eemaldatakse see kandjalt veevaba vesinikflouriidi (HF) abil. Seda meetodit kasutatakse hoolimata kõrgeast saagikusest vähe, sest HF on tugev hape ja võib põhjustada peptiidahela struktuuri lagunemist.

Fmoc keemia puhul on aminohappe N^{α} kaitserühm aluslabiilne 9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül (Fmoc) rühm. (Carpino ja Han, 1972) Kõrvalahelad on seevastu kaitstud happelabiilsete rühmadega. Fmoc rühma eemaldamine toimub aluselises keskkonnas, näiteks 20% piperitiini lahuse juuresolekul. Seevastu happelabiilsed kaitserühmad eemaldatakse näiteks trifluoroatseethappe (TFA) juuresolekul. Reaktsiooni võib lisada tioole või silaane, näiteks triisopropüülsilaani (TIS), mis neutraliseerib eemaldunud kaitserühmad ning ei lase neil uuesti kinnituda. Seega on võimalik ajutiste ja alaliste

kaitserühmade eemaldamiseks ning peptiidi eemaldamiseks kandjalt kasutada erinevaid meetodeid, mis ei kahjusta peptiidahela struktuuri.

SPPS reaktsiooni edukuse jälgimine on keeruline. Pole otstarbekas analüüsida vaheproduktide õigsust ning seetõttu kasutatakse vahereaktsioonide efektiivsuse kontrollimiseks ninhüdriini ehk Kaiseri testi. Test põhineb ninhüdriini võimel siduda vabade aminorühmadega ning moodustada sinine ühend, mida on võimalik visuaalse vaatluse tulemusena detekteerida. Seevastu vabade aminorühmade puudumisel jääb ühend kollaseks. Selle testi abil on võimalik kontrollida vastava vaheetapi edukus ning vajadusel saab viimast sammu korrata. (Kaiser *et al.*, 1970)

SPPS strateegia omab mitmeid eeliseid. Esiteks, see lihtsustab ja kiirendab sünteesireaktsiooni, sest protseduuri on võimalik viia läbi ühes reaktsiooninõus ning seeläbi välditakse reaktsiooni lähteainete kadusid. Teiseks on võimalik reaktsioon läbi viia suure saagikusega, sest reagente saab kasutada ülehulgas ning reaktsioon viiakse seetõttu kindlasti lõpuni. Kolmandaks on võimalik üleliigsed reagendid ja kõrvalproduktid kergesti välja filtreerida ning säilitada peptiidahela intaktsus. (Merrifield, 1969)

1.6.1. Sünteesitud peptiidi puhastamine

Sünteesitud ja tahkelt kandjalt eemaldatud peptiid puhastatakse ning eraldatakse sobimatutest kõrvalproduktidest pöördfaasilise vedelkromatograafia abil (RP-HPLC). RP-HPLC teel läbiviidud puhastamine põhineb peptiidi ja statsionaarse faasi hüdrofoobsetel interaktsioonidel. Protsessi läbiviimiseks kasutatakse klaasist või roostevabast terasest kolonne, millel pinnal on statsionaarse faasina toimiv silikageel muudetud hüdrofoobseks hüdroksüülrühmade asendamisel mittepolaarsete alküülrühmadega. (Zorko, 2010) Nendeks on tavaliselt oktaadetsüül (C18), n-oktüül (C8), n-butüül (C4) (Aguilar, 2004). Mobiilses faasis kasutatav solvent on samuti mittepolaarne. Peptiidi elueeritakse vee ja orgaanilise solvendi, näiteks atrseetonitriili (ACN) lahuses läbi kolonni. Elueerimisel tõstetakse ACN-i kontsentratsioonigradiendi vahemikus 5% - 80%. (Zorko, 2010) Madalama solvendi kontsentratsioonigradiendi puhul elueeritakse esimesena välja hüdrofiilsemad ühendid. Gradiendi tõstmisega muutub mobiilne faas vähem polaarseteks ning see soodustab hüdrofoobsemate ühendite eraldumist. Seetõttu liiguvad polaarsemad hüdrofiilsed ained pöördfaaskolonnis kiiremini vähempolaarsetest ja hüdrofoobsetest ainetest.

1.6.2. Sünteesitud peptiidi analüüsimine MALDI-TOF meetodiga

Massispektromeetria (MS) meetodid eraldavad molekule massi ja laengusuhte alusel. Sünteesitud peptiidi õigsuse kontrollimiseks kasutataksegi valdavalt MALDI-TOF (*matrix-*

assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) meetodit. Väike kogus uuritavat ühendit segatakse maatriksiga, mis eraldab lahusemolekulid üksteisest ja kaitseb neid laserkiirte degradeeriva toime eest. Tavaliselt kasutatakse maatriksina α -tsüaano-4-hüdrosükaneel hapet (CHCA). (Pan *et al.*, 2007) Saadud analüüt pipeteeritakse spetsiaalsele plaadile ning proov kuivatatakse. Seejärel asetatakse plaat massispektromeetrisse, kus pulseeriva laserkiire toimel ioniseeritakse uuritav aine ning ioonid viiakse seeläbi gaasifaasi. Ioniseeritud molekulid lahutatakse lennutorus elektrivälja toimel vastavalt lennuajale ning registreeritakse lennutoru lõpus asetseval detektoril. Iga registreering avaldatakse graafiliselt arvutiekraanil piigina. (Gräslund, 2010) Detektorini jõudmise aeg sõltub iooni massist ja laengust. Suurema massiga osakesed lenduvad aeglasemalt kui väiksema massiga. Sünteesitava peptiidi arvutatud molekulmassiga võrreldud MALDI-TOF-i tulemus võimaldab määrata produkti olemasolu analüüdis.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks on:

1. Sünteesida Fmoc/t-Bu tahke faasi strateegiat kasutades järgmised NickFect perekonda kuuluvad rakku sisenevad peptiidid:
NF 51: stearüül- A G Y L L G O I N L K A L A A L A K K I L- NH₂
NF 55: stearüül- A G Y L L G O I N L K A L A A L A K A I L- NH₂
NF 56: stearüül- A G Y K L G O I N L K A L A A L A K A I L- NH₂
2. Puhastada saadud produktid RP- HPLC meetodiga ja teha kindlaks õigete produktide olemasolu MALDI-TOF massispektromeetri abil.
3. Moodustada saadud RSP-de ja pGL3 plasmiidiga nanokompleksid NF51/pGL3, NF55/pGL3 ning NF56/pGL3. Uurida NF 55 ja NF 56 nanopartiklite transfektsiooniefektiivsust, kasutades lutsiferaasi ekspressioonil põhinevat mõõtmisüsteemi seerumit sisaldavas söötmes. Võrrelda nende RSP-de võimet transportida pDNA-d disainil aluseks võetud NF 51-ga ning kommertsiaalse *Lipofectamine*TM 2000-ega.
4. Iseloomustada NF55/pGL3 ja NF56/pGL3 nanopartiklite stabiilsust hepariini soola juuresolekul.
5. Hinnata positiivse laengute arvu ja jaotuse mõju peptiidi transfektsiooniefektiivsusele ja nanopartiklite stabiilsusele. Selleks võrreldakse peptiidi NF 51 analoogidega NF 55, kus 19. positsioonis asuv lüsiin (Lys19, K) on eemaldatud ja asendatudalaniiniga (Ala19, A), ja NF 56, kus lüsiin on asendatud tagasi peptiidahela neljandasse positsiooni (Lys4, K).

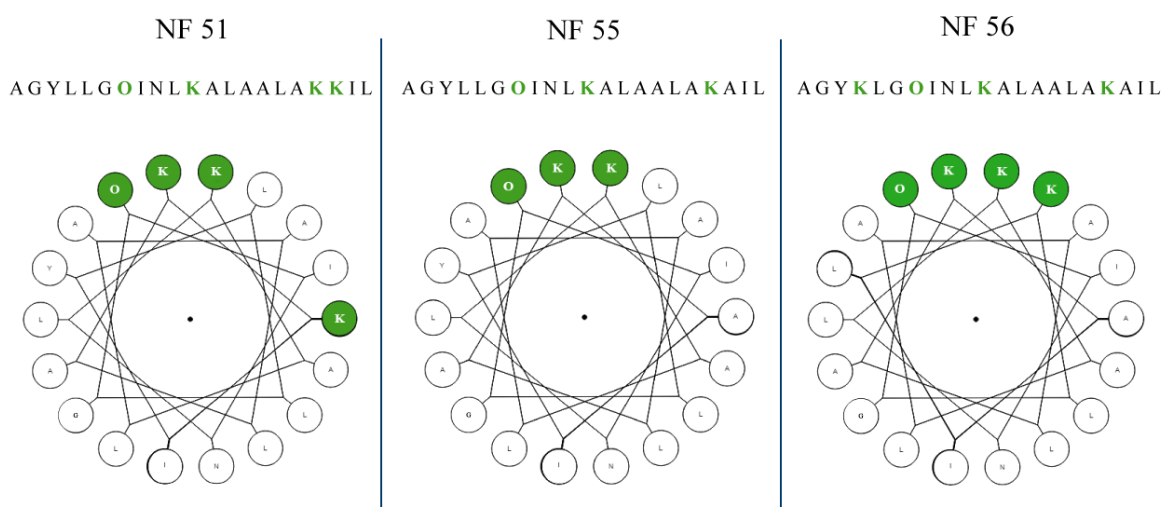
2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Peptiidide disain ja süntees

NickFect 51 on hetkel üks efektiivsemaid transfektsioonivektoreid nukleiinhapete rakku viimiseks. NF 51 võib moodustada pDNA-ga liiga stabiilseid mittekovalentsetel interaktsioonidel põhinevaid nanokomplekse, mis võib takistada lastmolekuli vabanemist sihtmärkrakus. (Arukuusk *et al.*, 2013) Selle tulemusena võib bioaktiivne aine omada rakus madalamat terapeutilist efekti. Komplekside stabiilsust võib põhjustada positiivselt laetud kõrvalahelatega aminohapete arv peptiidahelas. Stabiilsuse optimeerimiseks eemaldati positiivse laenguga lüsiin NF 51 aminohappeahela 19. positsioonist (Lys19, K) ja asendatialaniiniga. Vastav muutus viidi läbi selleks, et selgitada, kas see võib vähendada

elektrostaatilise interaktsiooni tugevust lastmolekuliga ning indutseerida selle efektiivsemat vabanemist rakus. Saadud peptiidile pandi nimeks NF 55. Hindamaks selle positiivse laengu mõju ning paiknemist RSP-de omadustele, lisati lüsiin tagasi ahela neljandasse positsiooni (Lys4, K) ja saadi peptiid nimega NF 56.

Antud sekundaarsete amfipaatsete peptiidide aminohappelise järjestuse muutuste aluseks on võetud peptiidahela α -heeliksi struktuur, sest on näidatud, et RSP-d moodustavad rakumembraaniga interakteerudes α -heelikseid (Ziegler, 2008) (Joonis 4). Mudelite konstrueerimisel on kasutatud internetist kättesaadavat *helical wheel* programmi (<http://kael.net/helical.htm>), mis genereerib α -heeliksi struktuuri otsevaates. NF 51 puhul asetseb järjestuses 19. positsioonil olev lüsiin heeliksis individuaalselt teistest samanimelistest laengutest eemal. Selline paiknemine võib avaldada toimet nanokompleksi stabiilsusele. Asenduste tulemusena saadi NF 55, milles kolm positiivset laengut (Orn7, Lys11, Lys18) paiknevad lähestikku. Hindamaks positiivse laengu toimet RSP-de omadustele, lisati NF 56 puhul lüsiin tagasi ahela neljandasse positsiooni, mis tõi α -heeliksis positiivsed laengud üksteisele lähedale (Lys4, Orn7, Lys11, Lys18). See võimaldab hinnata α -heeliksis paikneva ühe positiivse laengu toimet peptiidi transfektsiooniefektiivsusele ning nanokompleksi stabiilsusele.



Joonis 4. Positiivselt laetud aminohapete paiknemine NF51, NF55 ja NF56 ahelas ning α -heeliksis.

Peptiidide sünteesiks kasutati Fmoc/t-Bu tahke faasi peptidisünteesi strateegiat. Peptiidid sünteesiti 0,1 mmol skaalas nii käsitsi kui ka peptidisüntesaatoriga (Applied Biosystems, AB1433A). Mõlemal juhul kasutati tahke kandjana 240 mg MBHA (Orpechem, Saksamaa) vaiku, millele olid kinnitunud funktsionaalrühmadega vahelülid 0,41 mmol/g kandja kohta. Peptiidahela süntees viidi läbi C-terminusest N-terminuse suunas. Käsitsi sünteesimisel võeti aminohappeid 5-kordses ja süntesaatori puhul 10-kordses ülehulgas

funktsionaalrühmadega vahelülide kohta. Liidetavad aminohapped aktiveeriti 4-kordses ülehulgas võetud HOBt-i ja HCTU-ga ning 8-kordses ülehulgas võetud DIEA lisamisel. Selleks kasutati 0,5 M lahused HCTU/DMF ja HOBt/DMF ning 5,8 M DIEA, mis lisati DMFis (reagendid Sigma-Aldrich, USA) lahustatud aminohappele reaktsioonikolonnis. Ajutiste aluslabiilsete Fmoc kaitserühmade eemaldamiseks kasutati 20%-list piperitiini/DMF-i lahust. Käsitsi sünteesimisel kontrolliti Fmoc rühma eemaldamist ja uue aminohappe liitumist Kaiseri testiga. Vajadusel korrati aminohappe sidumise protsessi. Mõlema sünteesiprotsessi puhul lisati valminud peptiidahela N-terminaalsesse otsa käsitsi stearoüülrühm.

Peptiidijärjestuse lõikamine tahkelt kandjalt ja kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamine viidi läbi TFA, TIS (Sigma-Aldrich, USA) ja vee lahusega vahekorras 95:2,5:2,5. Saadud lahus suruti 3 tunni möödumisel läbi filtriga süstla, et eemaldada peptiid vaigult. Seejärel lisati saadud lahusele 5 ml vett peptiidi sadestamiseks. Vesilahusele valati 45 ml jääkülma eetrit ning saadud lahust loksutati, et ekstraheerida lahustunud orgaanilised kõrvalühendid. Tekkinud kahefaasilist lahust külmutati -80 °C juures vesifaasi jäätumiseni. Eeter eemaldati ning vesifaasi jäänud peptiidi kuivatati lüofilisaatoris üleöö.

Seejärel puhastati peptiid kõrvalproduktidest RP-HPLC (Agilent Technologies, USA) abil, kasutades C-18 kolonni ning 40% - 80% ACN/H₂O gradienti. Gradiendilahus sisaldas 0,1% TFA-d. Saadud produktide õigsuse määramiseks kasutati MALDI-TOF massispektromeetrit. Väike kogus peptiidi segati α -tsüaano-4-hüdrosükaneelhappega (CHCA) ning proov kuivatati spetsiaalsel plaadil. Analüüt ergastati pulseeriva laserkiire toimel ning ioniseeritud molekulide lennukiirus registreeriti lennutorus. Massispektromeerti abil mõõdetud analüüdi molekulmassi võrreldi peptiidi arvutusliku molekulmassiga ning identifitseeriti õiged produktid. Seejärel peptiid külmutati üleöö, lüofiliseeriti ning säilitati 1 mM lähtelahustena sügavkülmas.

2.2.2. Transfekteeritavate rakkude kultiveerimine

Antud töös kasutati Henrietta Lacksi (HeLa) emakakaelavähi rakuliini. Rakke kasvatati inkubaatoris (Sanyo, Japan) 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes. Rakukultuure lahjendati iga 2 kuni 3 päeva tagant vältimaks rakkude ülekasvamist ühekihilises kultuuris ning hoidmaks täituvust alla 100%. HeLa rakke kasvatati *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Naxo, Eesti) söötmes, millele oli lisatud 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati (Life Technologies, USA), 10% veise looteserumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini.

2.2.3. RSP ja plasmidi nanokompleksi moodustamine

Antud katses kasutati lastmolekulina 5256 aluspaari suurust pGL3-Control vektorplasmidi (Promega, USA), millesse on integreeritud jaanimardika (*Photinus pyralis*) lutsiferaasi tootva geeni muudetud osa. Plasmiidilt rakkudes ekspresseeritud valguprodukt võimaldab efektiivselt hinnata peptiidi transfektsioonivõimet. Nanokompleks moodustub tänu elektrostaatilistele interaktsioonidele plasmidi fosfaatselgroo negatiivsete laengute ja peptiidijärjestuses olevate positiivselt laetud aminohapete vahel.

Nanokompleksid moodustati 1 h enne transfektsiooni. Selleks segati kokku erinevas vahekorras uuritava peptiidi 100 µM vesilahus, 0,05 mg/ml plasmiidilahus ning destilleeritud vesi summaarse lõppruumalaga 180 µl. Kusjuures lahuste tegemisel järgiti erinevaid teoreetilisi laengusuhteid (*charge ratio*, CR) vahemikus 1:1 kuni 1:4 (Tabel 2). Peptiidide rakku sisenemise efektiivsuse hindamiseks moodustati nanokompleks plasmidi ja kommertsiaalselt saadava *Lipofectamine*TM 2000-ga (Invitrogen, USA).

Tabel 2. Peptiidide lõplik kontsentratsioon (µM) erinevate CR puhul ühes kaevus

Peptiid	CR 1	CR 2	CR 3	CR 4
NF 51	0,76	1,52	2,28	3,03
NF 55	0,99	1,99	2,99	4,00
NF 56	0,76	1,52	2,28	3,04

2.2.4. Rakkude transfekteeimine

Transfektsiooni läbiviimiseks külvati 24 h enne katse algust rakud 24-kaevulistele plaatidele kontsentratsiooniga 50 000 rakku kaevu kohta. Transfektsiooniks oli vajalik kaevu 75 kuni 90%-line rakuline täituvus. Selleks kultiveeriti rakke 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes inkubaatoris. Enne transfektsiooni pesti rakke PBS-iga, et eemaldada surnud ja mittekinnitunud rakud ning vana söötme jäägid. Seejärel kanti rakkudele 450 µl uut seerumiga söödet ning 50 µl nanokompleksi lahust varieeruv laengusuhtes 1:1 kuni 1:4. Rakkudele lisatud plasmidi ja peptiidi komplekside ruumala moodustas 1/10 rakkudele kantavast lahuse lõppruumalast (500 µl). Positiivse kontrollina kasutati *Lipofectamine*TM 2000 vastavalt tootja protokollile. Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ja rakke, mille lahusesse lisati 50 µl puhast pGL3 plasmidi lahust samas kontsentratsioonis, mida kasutati ka transfektsiooniks. Nanokompleksidega transfekteeeritud rakke inkubeeriti 4 h 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes, misjärel eemaldati kaevudest sööde ning rakkudele lisati 1000 µl puhast täissöödet.

Lisaks kasutati nanokomplekside transfektsiooni efektiivsuse iseloomustamiseks pGL3 ja peptiidi vaheliste elektrostaatiliste interaktsioonide tugevust. Selleks voolutati

nanokomplekse erinevatel laengusuhtel (CR 1:1, CR 1:2, CR 1:3, CR 1:4) 1% agarosgeelil TAE puhvis konstantse 60 mA voolutugevuse juures. Geelipilt saadi 260 nm lainepikkuse UV valguse juures. Pilt võimaldab hinnata nanokompleksis vaba pGL3 olemasolu erinevatel peptiidi:plasmiid laengusuhetel.

2.2.5. Peptiidide transfektsiooniefektiivsuse hindamine

20 tundi pärast transfektsiooni eemaldati rakkudelt sööde ja neid pesti PBS-iga. Seejärel lüüsi rakke 100 µl 0,1%-lise Triton-X ja PBS-i (Naxo, Eesti) lahusega 30 minutit 4 °C juures. Järgmise etapina kanti 20 µl saadud rakulüsaati valgele 96- kaevulisele plaadile ja lisati 80 µl *Luciferase Assay Reagent*-i. Vahetult pärast seda mõõdeti plasmidi lutsiferaasi tootmisaktiivsus *GloMaxTM 96 microplate* luminomeetritiga (Promega, Rootsi). Rakkudesse RSP-de abil transfekteritud pGL3 plasmiidilt toimub lutsiferaasi ensüümi süntees. Lutsiferaas on oksüdatiivne ensüüm, mis reageerib lutsiferiiniga. Selle reaktsiooni tulemusena eraldub luminesents, mida saab mõõta luminomeetriga. Luminomeetriga saadud tulemused normaliseeriti vastavate proovide valgukontsentratsioonidega, kasutades selleks spetsiaalset määramise komplekti (Bio-Rad Laboratories Inc, USA), mis põhineb Lowri meetodil. Selleks pipeteeriti 5 µl rakulüsaadi lahust läbipaistvale 96-kaevulisele plaadile ning proovidele lisati komplektis olevaid reagente. Seejärel mõõdeti valgu absorptsioon 700 nm lainepikkusel *Sunrise* (Tecan, Šveits) tehnoloogiaga. Normaliseerimine on vajalik selleks, et vältida rakkude arvukusest tulenevaid vigu. Katsete keskmised tulemused esitatakse *Prism* (GraphPad, USA) programmi abil peptiidide lõikes tulpdiagrammina RLU/mg ühikutes.

2.2.6. Nanokompleksi stabiilsuse hindamine

NF 51/pGL3, NF 55/pGL3 ja NF 56/pGL3 nanokomplekside stabiilsuse hindamiseks töödeldi RSP-sid plasmiidiga konkureeriva anioonse ühendiga (hepariini soola lahusega). Selleks moodustati peptiidi ja pGL3 vahel nanokompleksid eelpool kirjeldatud viisil ning neid inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Seejärel lisati 100 µl-le kompleksile erineva kontsentratsiooniga hepariini lahust (lõppkontsentratsiooniga 0,25 kuni 8 mg/ml lahuse kohta). Hepariini (Sigma-Aldrich, USA) lisamise järel inkubeeriti lahust 37 °C juures 30 minutit. Seejärel lisati lahusele hepariini poolt kompleksist välja tõrjutud pGL3 koguse hindamiseks DNA aluspaaride vahele seostuvat fluorokroomi *PicoGreen[®]* (Invitrogen, USA), mis on võimeline seostuma selektiivselt plasmidi aluspaaride vahele. Seostunult *PicoGreeniga[®]* on võimalik pGL3 hulka kvantifitseerida fluoresteerumise abil (480nm/520nm) suure täpsusega (Ahn *et al.*, 1996). *SynergyMx* (BioTek, USA) fluoromeetriga registreeriti vaba pGL3 hulk lahuses ning tulemused esitati *Exceli* graafikuna.

2.2.7. Tsütotoksilisuse hindamine

Antud töö raames hinnati nii peptiid/plasmiid nanokompleksi kui ka peptiidi mõju rakkude elumusele (*cell viability*). Selleks külvati 96- kaevulise plaadi igasse kaevu 10 000 HeLa rakku 100 µl-is DMEM täissöötmes 24 tundi enne eksperimendi läbiviimist. Seejärel moodustati nanokompleksid plasmiidi pGL3 ja erinevate laengusuhetel (CR 1, CR 2, CR 3, CR 4) peptiididega (NF 51, NF 55, NF 56) ning *LipofectamineTM 2000*-ga. Lisaks moodustati peptiidide vesilahused kontsentratsioonidel 0,5; 1; 2,5 ja 5 mM.

Komplekse inkubeeriti 30 minuti jooksul toatemperatuuril ning lisati söötmele. Eelmisel päeval külvatud rakkudelt eemaldati vana sööde ning neile lisati 90 µl uut täissöödet ja 10 µl komplekse söötmes või peptiidi. Transfekteerimiseks inkubeeriti rakke 37 °C juures 4 tundi. Seejärel vahetati rakkudel sööde, lisati 200 µl uut täissöödet ning inkubeerimine jätkus 20 tundi.

Järgmisel päeval hinnati peptiidi/plasmiid nanokompleksi ning peptiidi mõju rakkude elumusele toksilisusega seotud proteaasi aktiivsuse kaudu, kasutades selleks *CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay*'d (Promega, USA). Esmalt pipeteeriti igasse kaevu 50 µl luminogeenset *AAF-GloTM* substraati, mis võimaldab mõõta surnud ja membraani intaktsuse kaotanud rakkude proteaaside aktiivsust. 15 minutit pärast substraadi lisamist mõõdeti luminomeetriga *GloMax[®]* aminolutsiferiini luminesstsents ning saadi surnud rakkude arvukus. Seejärel lüüsi elusad rakud 50 µl lüüsilahuse (*Lysis Reagent*) lisamisega igasse kaevu. Lüüsilahus saad komplektis oleva *Digitonini* ja *Assay Buffer*'i segamisel. 15 minuti möödumisel mõõdeti luminesstsents uuest ning saadi totaalne rakkude arvukus. Rakkude elumuse saab määrata arvutuslikult lahutades totaalsest rakkude arvukusest surud rakkude arvukuse. Tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkude vastu ning esitatakse tulpdiaagrammina kasutades Prismi programmi.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Peptiidide süntees ja nanokomplekside moodustamine

Antud töös disainiti kaks uut NickFect 51-l (Arukuusk *et al.*, 2013) põhinevat sekundaarset amfipaatsset rakku sisenevat peptiidi. Esimene peptiid, mille ahela 19. positsioonilt eemaldati füsioloogilisel pH-l positiivset laengut omav lüsiin (Lys19, K) ning asendatialaniiniga, (Ala19, A) kandis nime NF 55. Teine peptiid kandis nime NF 56 ning ahela neljandas positsioonis olev leutsiin (Leu4, L) asendati lüsiiniga (Lys4, K) (Tabel 3). Vastavatel positsioonidel aset leidnud muutused viidi läbi selleks, et tuua peptiidide α -heeliksi konformatsioonis positiivsed laengud üksteisele lähemale ning mõjutada seeläbi nanokomplekside stabiilsust ja peptiidide transfektsiooniefektiivsust. Sekundaarsed amfipaatsed peptiidid lähevad rakumembraaniga interakteerudes üle α -heeliksi struktuuri, mis võimaldab peptiidil võtta energeetiliselt stabiilseima konformatsiooni tänu laengute optimaalsele jaotamisele heeliksis. (Ziegler, 2008) NF 55 ja NF 56 modifikatsioonid tehti eesmärgiga hinnata, kuidas mõjutab positiivse laenguga aminohapete arvu vähendamine ning nende paiknemine α -heeliksis peptiid/pDNA nanokompleksi stabiilsust ning transfektsioonilist aktiivsust.

Tabel 3. Sünteesitud peptiidide järjestused ning vastavate aminohapete asendused koos peptiidide molekulmassi ning positiivsete laengute koguhulgaga

Peptiid	Järjestus	Molekulmass	"+" laenguid
NF 51	Stearüül- AGYLLGOINLKALAALAKKIL- NH ₂	2434 g/mol	4
NF 55	Stearüül- AGYLLGOINLKALAALAKAIL- NH ₂	2377 g/mol	3
NF 56	Stearüül- AGYKLGOINLKALAALAKAIL- NH ₂	2449 g/mol	4

Peptiidid sünteesiti Fmoc/t-Bu tahke faasi peptiidsünteesi strateegiat kasutades. NF 51 ja NF 55 sünteesiti automaatsüntesaatoriga ning NF 56 käsitsi. Mõlemal juhul lisati peptiidahela valmides N-terminaalsesse otsa käsitsi stearoüülrühm, mille puhul on näidatud, et see aitab peptiididel endosoomidest vabaneda ning pDNA-d kompleksis paremini kondenseerida. (Lehto *et al.*, 2011) Süntees lõppes tahkelt kandjalt peptiidi eemaldamisega 95% TFA, 2,5% vee ja 2,5% TIS lahusega. Saadud peptiid sadestati vees ning orgaanilised jäägid ekstraheeriti jääkülmas eetris. Vesifaasis olev peptiid külmutati ja kuivatati üleöö lüofilisaatoris. Produktid puhastati RP-HPLC meetodil kõrvalproduktidest. Selleks lahustati kuivatatud produktid 2 ml-s 20% ACN/H₂O lahuses 0,1% TFA juuresolekul. Lõpuks analüüsiti puhastatud sünteesiprodukte MALDI-TOF massispektromeetriga selleks, et veenduda peptiidide õigsuses.

Seejärel moodustati rakkude transfekdeerimiseks peptiidide ja pDNA (pGL3-*Control*) vahel mittekovalentsel ko-inkubatsiooni strateegial nanokompleksid erinevatel peptiid:plasmiid laengusuhetel (CR 1:1 kuni 1:4). Mittekovalentne meetod on kiire ning efektiivne võimalus lastmolekulide sidumiseks peptiidiga. Varasemalt on näidatud, et RSP-d on võimelised transportima edukalt nii *in vitro* kui *in vivo* oludes endaga mittekovalentselt seotud valke, peptiide, plasmide ja ON-e rakkudesse. (Deshayes *et al.*, 2008)

2.3.2. Nanokomplekside iseloomustus

Nukleiinhapped nagu pDNA-d, SKO-d ja siRNA-d on potentsiaalsed vahendid ravimaks erinevaid haigusseisundeid geneetilisel tasandil. Kahjuks ei suuda nukleiinhapped tänu suurele molekulmassile ja negatiivsele laengule läbida rakumembraane ning seetõttu on selliste ravimite praktiline rakendamine piiratud. Lisaks on nukleiinhapped rakkude poolt kiiresti lagundatavad. (Lopez-Fraga *et al.*, 2008) RSP-d on mitmekülgsed transportvektorid, mis võivad osutada potentsiaaliks nende takistuste ületamisel, sest suudavad transportida nukleiinhappeid rakutuumas. (Lehto *et al.*, 2011)

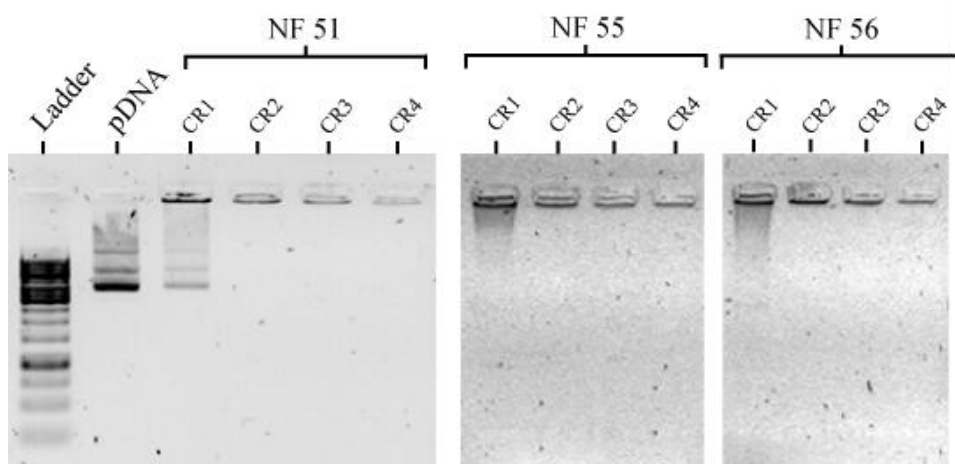
RSP-de edukaks rakendamiseks *in vivo* oludes on oluline, et nanokompleks oleks optimaalse stabiilsusega. Lastmolekul ei tohi olla seotud peptiidiga liiga nõrgalt, sest see võib põhjustada kompleksi enneaegse lagunemise ja ühend ei jõua seetõttu terapeutilise efekti avaldamiseks sihtmärkrakku või -organelli. Samas peab kompleks olema vastupidav ensümaatilisele degradatsioonile organismis. Transporditav ühend ei tohi olla seotud peptiidiga liiga tugevalt. Sellisel juhul võib nanokompleks küll jõuda sihtmärgini, kuid lastmolekul ei suuda avaldada bioloogilist efekti, sest see ei vabane peptiidi küljest õigeaegselt. Optimaalne nanokompleksi stabiilsus tähendab seda, et lastmolekul vabaneb peptiidi küljest alles siis, kui RSP on jõudnud mitmesuguseid bioloogilisi barjääre ületades transportida ühendi sihtmärgini. (Viola *et al.*, 2010)

Selle saavutamiseks on rakendatud erinevaid strateegiaid. Näiteks, on näidatud, et stearoüülhappe lisamine või C-terminuse amideerimine aitavad moodustada nukleiinhapetega tugevamaid mittekovalentselt konjugeeritud nanokomplekse (Ezzat *et al.*, 2012). Üheks perspektiivikamaks lahenduseks on hargnenud ahelaga RSP-de loomine. Näiteks, on NF 51 puhul näidatud, et seitsmendas positsioonis olev ornitiin (Orn7, O), mis on ahelasse seotud kõrvalahela amiidrühma abil (γ -NH₂), aitab moodustada tugevamaid nanokomplekse pDNAga. Need kompleksid on vastupidavamad ensümaatilisele degradatsioonile, sest ornitiin peptiidahelas suudab pDNA paremini kokku pakkida. NF 51 on küll seetõttu väga hea transfektsiooniagent, kuid peptiid kipub moodustama pDNA-ga liiga tugevaid komplekse, mis

ei lase plasmiidil rakus vabaneda. (Arukuusk *et al.*, 2013) Seetõttu ei suuda pDNA avaldada nii suurt efekti rakus kui võiks.

Nanokompleksi tugevuse optimeerimiseks disainiti NF 55, mille järjestusest eemaldati lüsiin (Lys19,K), et vähendada positiivsete laengute arvu peptiidis ning mõjutada seeläbi interaktsiooni tugevust negatiivselt laetud plasmiidiga. Eesmärgiks oli säilitada NF 51 transfektsiooniline aktiivsus, kuid luua optimaalsema nanokompleksi stabiilsusega RSP. Püstitati hüpotees, et selline modifikatsioon võimaldab plasmiidil kergemini peptiidi küljest rakus vabaneda. Füsioloogilisel pH-l positiivselt laetud lüsiini toime uurimiseks asendati see tagasi NF 55 ahela neljandasse positsiooni (Lys4, K) ning saadi NF 51-ga sama positiivse summaarse laenguga peptiid NF 56.

Saadud RSP-de ja pGL3 plasmiidiga moodustati nanokompleksid NF 51/pGL3, NF 55/pGL3 ja NF 56/pGL3 eespool kirjeldatud tingimustel (alateema 2.2.3) selleks, et hinnata nanopartiklite stabiilsust, transfektsioonivõimet ja toksilisust. Esmalt hinnati peptiidide modifikatsiooni mõju pDNA pakkimisele nanokompleksiks. Moodustati nanokompleksid CR 1:1 kuni 1:4, kus peptiidi võeti plasmidi kohta ülehulgas selleks, et näha milline kogus peptiidi suudab plasmidi nanokompleksi pakkida. Plasmiid pGL3-*Control* on 5326 bp suurune nukleiinhape ja komplekside moodustamisel võeti arvesse peptiidi summaarset positiivset laengut. Seega oli komplekside moodustamisel NF 55 peptiidi kontsentratsioon lahuses kõrgem kui NF 51 ja NF 56 puhul. Komplekse voolutati 1% agarosgeelil 0,5x TAE puhvis. Saadud tulemused esitati UV valguses pildistatud geelipildina (Joonis 5).

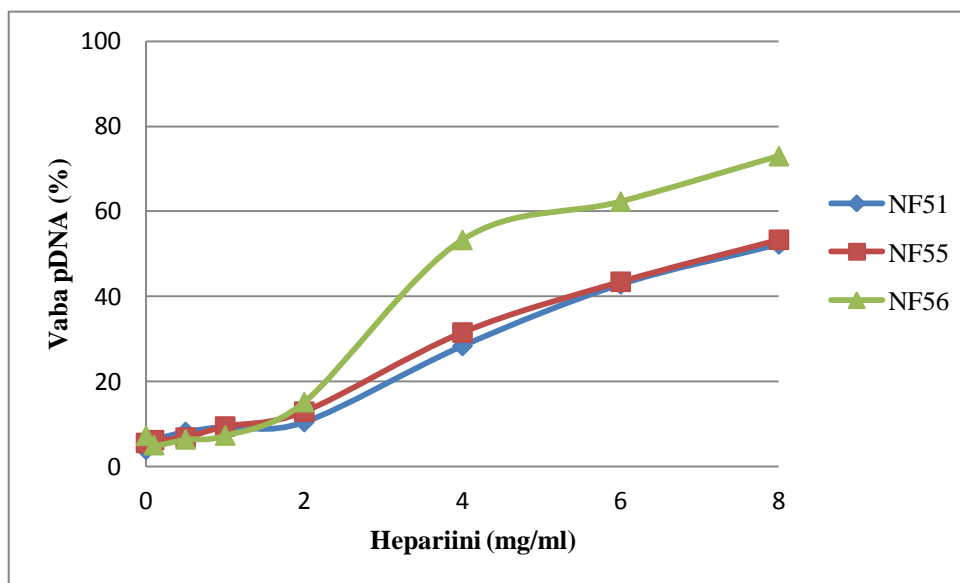


Joonis 5. Vaba pGL3 olemasolu nanokompleksides erinevate CR korral. Vaba plasmidi olemasolu nanokompleksis CR 1 korral näitab seda, et sellel laengusuhtel ei ole RSP-de kogus piisav pDNA kondenseerimiseks nanokompleksi.

Kõigi kolme peptiidi korral ei ole laengusuhe (CR 1) 1:1 piisav kogu pDNA kondenseerimiseks nanokompleksi. Alates laengusuhtest 1:2 on peptiidid juba võimelised kogu pDNA siduma ning vaba plasmidi ei leidu. Seega ei mõjuta modifikatsioonid RSP-de

võimet kondenseerida pDNA-d nanokompleksi. Laengusuhetel 2 kuni 4 moodustavad peptiidid komplekse, mis on stabiilsed elektroporatsioonile ja püsivad geeli hambas.

Nanokomplekside stabiilsuse hindamine viidi läbi hepariini soola lahuse juuresolekul komplekse inkubeerides. Hepariin on pDNA-ga konkureeriv ühend, mis on võimeline interakteeruma positiivselt laetud aminohapetega ning tõrjuma välja kompleksist nukleiinhappe. Hepariini kontsentratsioon, mis tõrjub välja plasmidi, ning väljatõrjutud pDNA hulk iseloomustavad nanokompleksi stabiilsust. (Veiman *et al.*, 2013) Stabiilsuse katse viidi läbi peptiid:plasmid CR 1:3 juures, sest selline laengute suhe oli kõikide peptiidide puhul sarnase transfektsioonilise efektiivsusega (Joonis 7). Kompleksid moodustati CR 3 juures samadel kontsentratsioonidel nagu seda kasutati transfektsiooni katse puhul (Tabel 2). Nanokomplekse töödeldi hepariini erinevatel kontsentratsioonidel ning väljatõrjutud pDNA koguse kvantifitseerimiseks töödeldi lahust *PicoGreeniga*[®]. Saadud vaba pDNA hulk esitati protsentuaalselt (%) *Exceli* graafikuna (Joonis 6). Antud katse puhul viidi läbi ka korduskatse, mille tulemus vastas esmasele eksperimentile.



Joonis 6. NF 51/pGL3, NF 55/pGL3 ja NF 56/pGL3 nanokomplekside stabiilsus (CR3) hepariini erinevatel kontsentratsioonidel. Optimaalseima tugevusega nanokompleksi moodustas NF 56, kust pDNA suutis vabaneda kõige paremini.

Optimaalseima nanokompleksi stabiilsusega oli peptiid NF 56, mille puhul suutis peptiid hepariini kõrgematel kontsentratsioonidel vabastada pDNA-d kõige paremini. NF 51 ja NF 55 olid võrdväärselt tugevad hepariini erinevatel kontsentratsioonidel. NF 56 kompleksi stabiilsust võib mõjutada positsioonis number neli asetsev aminohape. Kuigi NF 56 summaarne positiivne laeng on sama nagu NF 51, siis ei pruugi üks lisa positiivne laeng antud juhul mõjutada nanokompleksi stabiilsust. Tähtis roll võib olla just sellel piirkonnal, mis mõjutab peptiidi sekundaarstruktuuride moodustamist. NF 56 puhul lisati positiivne laeng kimäärse NF galaniini ossa. Nii NF 51 kui NF 55 puudub selles osas positiivne laeng.

Seetõttu võib arvata, et muutused NF 56 galaniini osas võivad mõjutada α -heeliksi moodustumist ning pDNA nanokompleksi kondenseerimist. NF 55 puhul eemaldati positiivne laeng mastoprani osast, mis aga oluliselt nanokompleksi stabiilsust ei mõjuta.

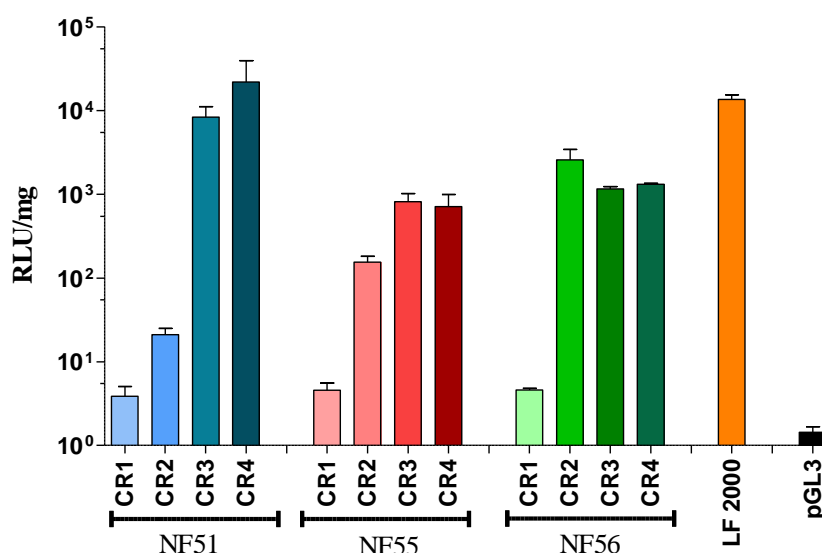
2.3.3. Transfektsiooniline efektiivsus

Transfektsiooniefektiivsus on üks põhiparameetreid, millega on võimalik iseloomustada transfektsioonivektorit. Transfektsiooniefektiivsus sõltub nii peptiidi järjestusest, lastmolekulist, komplekside moodustumisest kui ka rakuliinist ja inkubatsioonitingimustest. Antud katsed viidi läbi HeLa rakkudega, sest sama perekonna RSP-de puhul on *in vitro* katsed tehtud selle rakuliiniga. See võimaldab võrrelda tulemusi ning hinnata analoogsete peptiidide (NF 55, NF 56) transfektsioonilisi omadusi.

Transfektsiooni katse viidi läbi seerumiga söötmes, kasutades lutsiferaasi ekspressioonil põhinevat mõõtmissüsteemi. Pärast HeLa rakkude transfekteerimist nanokompleksidega erinevatel CR-l, inkubeeriti rakke 4 h 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes. Rakkudele lisatud plasmidi ja peptiidi komplekside ruumala moodustas 1/10 rakkudele kantavast lahuse lõppruumalast (500 µl). Positiivse kontrollina kasutati *Lipofectamine*TM 2000. Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ja rakke, mille lahusesse lisati puhast pGL3 plasmidi lahust samas kontsentratsioonis, mida kasutati ka transfektsiooniks. Rakkudes mõõdeti lutsiferaasi ekspressioon luminomeetriga. Tulemused normaliseeriti rakkude valgusisalduse vastu, et elimineerida surnud rakkudest tulenevad ebatäpsused. Saadud tulemused esitati Prism programmi kasutades tulpdiagrammil RLU-dena (Joonis 7).

NF 55 ja NF 56 on üldiselt madalama transfektsiooniefektiivsusega kui NF 51. CR 2 puhul aga osutus kõige efektiivsemaks transfektsioonivektoriks NF 56, mis ületas isegi NF 51 pea kolme kordselt. See näitab, et NF 56-e puhul on vaja vähem peptiidi (plasmid:peptiid, 1:2) pDNA transportimiseks rakku. Seega on NF 56 madalamal kontsentratsioonil efektiivsem transfektsioonivektor kui NF 51 või NF 55.

See efekt võib olla tingitud laeng-laeng interaktsioonides ning α -heeliksis lähestikku paiknevatest positiivsetest laengutes, mis võimaldavad väikesel hulgal peptiidil pakkida kokku efektiivsemalt pDNA ning transportida see rakku. NF 56 aktiivsus CR 2 puhul on suhteliselt kõrge ning kindlasti oleks järgmiseks sammuks peptiidi transfektsioonivõime katsetamine *in vitro* teistes rakuliinides ning *in vivo*.



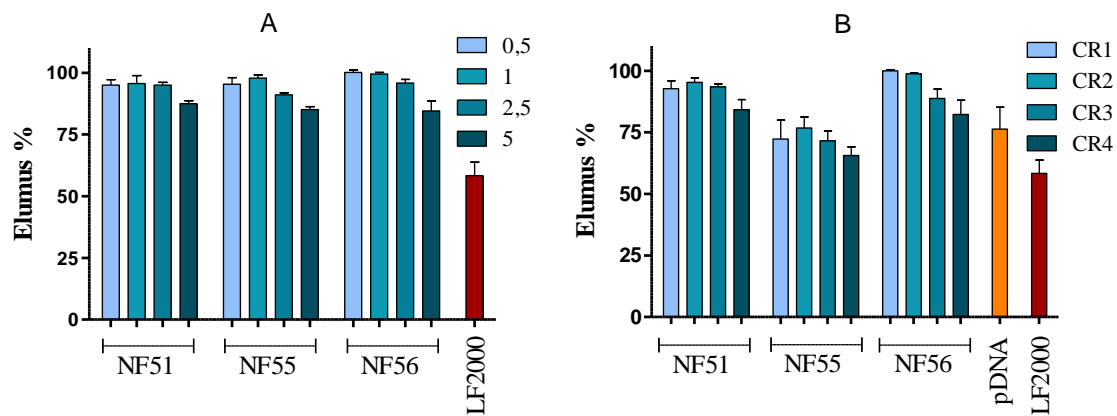
Joonis 7. NF 51, NF 55, NF 56 abil pDNA transfektsioon HeLa rakkudes. Tulemused on normaliseeritud vastavate proovide valgukontsentratsiooni vastu. Võrdluseks on lisatud LF2000 transfektsiooniline efektiivsus pDNA transporterina ning puhta pGL3 rakkudesse sisenemise võime.

Tulenevalt organismide keerukusest ei pruugi *in vitro* katsete edukus kajastuda *in vivo*. NF 56 edukas rakendamine CR 2 puhul võimaldaks kasutada transfekkeerimiseks madalamaid peptiidikontsentratsioone. See vähendaks soovimatute kõrvaltoimete ning toksilisuse efekti esinemise tõenäosust rakkudele. Ideaalselt peaks võimalikult väike kogus RSP-d transportima võimalikult palju pDNA-d rakku ning NF 56 CR 2 võiks selle eesmärgi täitmiseks sobida.

2.3.4. Peptiidide ja nanokomplekside toksilisus

RSP-de toksilisus rakkudele sõltub peptiidi kontsentratsioonist ja transporditavast lastmolekulist (El-Andaloussi *et al.*, 2007). RSP-d võivad rakku sisenedes põhjustada häireid rakumembraanis ning interakteeruda membraanivalkudega, põhjustades seeläbi tsütoplasma lekkimist (Lundberg ja Langel, 2003). Seetõttu on oluline uurida RSP-de mõju rakkude elumusele.

Antud töös hinnati nii puhta peptiidi kui ka nanokompleksi mõju HeLa rakkude elumusele, kasutades selleks *CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay*-d. Katses kaasati võrdlusesse komertsiaalne transfektsiooniagent LF 2000, mis on rakkudele toksiline. Nanokomplekside puhul on võrreldud mõju elumusele puhta plasmiidiga pGL3 (Joonis 8). Varasemalt on näidatud, et NF perekonda kuuluvad peptiidid on vähetoksilised. Näiteks, NF 51 (Arukuusk *et al.*, 2013) ning NF 1 ja NF 2 (Oskolkov *et al.*, 2011) ei avaldanud toksilist efekti SKO-de transportimisel HeLa rakkudes. Antud töös saadi sarnased tulemused ning olulist toksilist efekti nii peptiidide kui ka nanokomplekside puhul rakkudele ei täheldatud.



Joonis 8. Rakkude elumus transfektsiooni järel HeLa rakkudes seerumit sisaldavas söötmes. Joonis A näitab rakkude elumust puhta peptiidi lisamise (μM) järel. Joonis B näitab peptiid/plasmiid kompleksi mõju rakkude elumusele erinevate CR korral. Mõlemal joonisel on lisatud võrdluseks LF2000 ning joonise B puhul lisaks puhta pDNA efekt elumusele. Tulemused on normaliseeritud töötlemata HeLa rakkude vastu.

Varasemalt on näidatud puhta RSP toksilist efekti peptiidi kontsentratsiooni kasvades (Saar *et al.*, 2005), mis on vastavuses ka antud töös saadud tulemustega. Ainult RSP-de mõju (Joonis 8. A) rakkude elumusele kasvas kontsentratsioonid suurenedes. Kõige toksilisemaks osutusid peptiidid 5 μM kontsentratsiooni korral. Madalamatel kontsentratsioonidel olulist toksilisuse efekti rakkude elumusele ei täheldatud.

Nanokomplekside korral osutus kõige toksilisemaks NF 55 kõigi laengusuhete juures, kuna selle peptiidi kontsentratsioon oli lahuses oluliselt kõrgem (Tabel 2). See oli tingitud NF 55 väiksemast summaarsest positiivsest laengust (+3) võrreldes NF 51 (+4) ja NF 56-ga (+4). Kõrgema toksilisuse võis põhjustada lastmolekuliks olev pDNA, sest varasemad uuringud on viidanud lastmolekuli võimele mõjutada RSP-de transfektsioonivõimet ning toksilisust (El-Andaloussi *et al.*, 2007). pDNA-l on teatav toksiline efekt, sest puhta plasmiidi korral on elus ca 75% rakkudest. Seega võib see kombineeritult kõrgema NF 55 kontsentratsiooniga põhjustada suuremat toksilisuse efekti.

Üldjoontes ei mõjuta NF 56 modifikatsioonid CR 1 ja 2 korral rakkude elumust ning on sama ohutu nagu NF 51. See muudab võimalikuks NF 56 kasutamise *in vivo* katsete puhul, sest seal on töökonsentratsiooniks 2 – 3 μM . Võttes arvesse NF 56 kõrgemat transfektsioonilist efektiivsust CR 2 puhul (Joonis 7) ning madalat toksilisust, võib antud peptiid osutada perspektiivikaks transfektsioonivektoriks inimeste ravimise eesmärgil.

Kokkuvõte

Rakku sisenevate peptiidide näol on tegemist mitmekülgsete ja ohutute transpordivektoritega, mis suudavad rakkudesse viia erineva suurusega biomolekule. See võimaldaks praktikas edukalt rakendada RSP-sid makromolekulidel põhinevate terapeutikumide loomisel ning erinevate haiguste geneetilises ravis.

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldati erinevaid RSP-sid ning nende praktilisi rakendusi inimeste ravis. Lisaks räägiti lähemalt RSP-dega transporditavatest ühenditest ning peptiidide sisenemismehhanismidest. Lühike ülevaade käsitles peptiididega kaasnevaid võimalikke toksilisuse efekte ning peptiidide sünteesimise meetodit (SPPS). Toodi ülevaade RSP-de erinevatest modifikatsioonidest ning NF perekonda kuuluvatest peptiididest. Eksperimentaalses osas disainiti ja sünteesiti uued NF 51 analoogid NF 55 ning NF 56. Vastavad modifikatsioonid peptiidijärjestuses tehti selleks, et uurida positiivsete laengute arvu ja paiknemise mõju RSP võimele moodustada nanokomplekse ning transfekteerida rakke.

Katsetulemused näitavad, et modifikatsioonid peptiidiahelas ei mõjuta RSP-de võimet moodustada komplekse. Kõik kolm peptiidi (NF 51, NF 55 ja NF 56) on võimelised moodustama nanokomplekse laengusuhetel 2 kuni 4. Modifikatsioonidel on aga teatav mõju nanokomplekside stabiilsusele. NF 56 moodustab nõrgema nanokompleksi kui NF 51 või NF 55. See võib olla põhjustatud pigem positiivsete laengute jaotumisest kui arvust peptiidijärjestuses, sest olulist efekti võib omada järjestuse neljandas positsioonis aset leidvad muudatused.

Transfektiooniefektiivsus on üldiselt kõrgem NF 51-l ning seetõttu laengute arv ja paiknemine oluliselt peptiidi rakku sisenemist ei mõjuta. Siiski on CR 2 puhul kõige efektiivsem transfektioonivektor NF 56. See võimaldaks kasutada madalamat RSP kontsentratsiooni pDNA rakku viimisel.

Puhtad peptiidid on võrdväärselt vähetoksilised madalamatel kontsentratsioonidel. Nanokompleksidest on kõige toksilisem rakkudele NF 55, mis võib olla tingitud peptiidi kõrgemast kontsentratsioonist meediumis ning lastmolekuli loomusest. NF 51 ning NF 56 on võrdväärselt vähetoksilised kõigi laengusuhete korral.

Arvestades NF 56 nanokompleksi optimaalsemat stabiilsust, paremat transfektioonilist efektiivsust CR 2 korral ja madalat toksilist efekti rakkudele, on see RSP sobilik *in vivo* katseteks. Lisaks võiks uurida NF 56 võimet transportida erinevaid biomolekule (nt. ON, siRNA) mitmesugustesse rakuliinidesse.

New NickFect 51 analogues for the delivery of plasmid DNA inside the cell

Siim Uhtjärv

Summary

The main hurdle of implementing large biomolecule therapeutics for the treatment of various diseases lies in their inability to cross bilayered plasma membrane. Cell-penetrating peptides (CPPs) are short amino acid sequences which are capable of penetrating cell walls and delivering covalently or non-covalently attached cargoes inside the cell *in vitro* and *in vivo*. Not only can the size and nature of the attached cargoes vary greatly (e.g. pDNA, siRNA, ON, proteins) but also CPPs are generally considered versatile non-toxic transport vectors.

Based on stearyl-Transportan 10 or PepFect 3, NickFect 51 (NF 51) is one of the most efficient transfection agent described so far. However, it has been shown that the peptide tends to form too stable nanoparticles which upon reaching the desired destination cannot release cargo efficiently. Hence, the delivered biomolecule has a lower therapeutic effect on the disease. Therefore new NF 51 analogues (NF 55 and NF 56) were designed to study how the amount and distribution of positively charged amino acids in the peptide sequences would influence the transfection efficiency and nanoparticle stability. In addition, toxicity studies with pure CPP and nanocomplexes were carried out.

In this study, it was shown that both NF 55 and NF 56 have lower transfection rate when compared to NF 51. However, at charge ratio 2 NF 56 was most effective transfection agent among others. This would allow researchers to use lower concentrations of peptide for the delivery of electrostatically bound cargoes inside the cell. In addition, NF 56 had lower nanocomplex stability which combined with the low toxicity would make it an interesting CPP for *in vivo* studies.

To conclude, based on this research there is reason to believe that the amount of positively charged amino acids may not be a determining factor in terms of optimal nanocomplex stability and transfection efficiency. As results with NF 56 suggest, the distribution of positive charges in the peptide sequence may have effect on CPP abilities to penetrate cells and release cargoes.

Kasutatud kirjandus

- AGUILAR, M.-I. 2004. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: AGUILAR, M.-I. (ed.) *HPLC of Peptides and Proteins- Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Yersy: Humana Press Inc.
- AHN, S. J., COSTA, J. & RETTIG EMANUEL, J. 1996. PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre-or Psost-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24, 2623-2625.
- AL-DOSARI, M. S. & GAO, X. 2009. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11, 671-681.
- ANDALOUSSI, S., LEHTO, T., LUNDIN, P. & LANGEL, Ü. 2011a. Application of PepFect Peptides for the Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. In: LANGEL, Ü. (ed.) *Cell-Penetrating Peptides*. Humana Press.
- ANDALOUSSI, S. E., LEHTO, T., MAGER, I., ROSENTHAL-AIZMAN, K., OPREA, II, SIMONSON, O. E., SORK, H., EZZAT, K., COPOLOVICI, D. M., KURRIKOFF, K., VIOLA, J. R., ZAGHLOUL, E. M., SILLARD, R., JOHANSSON, H. J., SAID HASSANE, F., GUTERSTAM, P., SUHORUTSENKO, J., MORENO, P. M., OSKOLKOV, N., HALLDIN, J., TEDEBARK, U., METSPALU, A., LEBLEU, B., LEHTIO, J., SMITH, C. I. & LANGEL, U. 2011b. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res*, 39, 3972-87.
- ARUKUUSK, P., PARNASTE, L., OSKOLKOV, N., COPOLOVICI, D. M., MARGUS, H., PADARI, K., MOLL, K., MASLOVSKAJA, J., TEGOVA, R., KIVI, G., TOVER, A., POOGA, M., USTAV, M. & LANGEL, U. 2013. New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 1365-73.
- BOLHASSANI, A. 2011. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1816, 232-46.
- BRASSEUR, R. & DIVITA, G. 2010. Happy birthday cell penetrating peptides: already 20 years. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 2177-81.
- CARPINO, L. A. & HAN, G. Y. 1972. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry*, 37, 3404-3409.
- CONNER, S. D. & SCHMID, S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.
- COPOLOVICI, D. M., LANGEL, K., ERISTE, E. & LANGEL, U. 2014. Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis and Applications. *ACS nano*.
- DEROSSI, D., JOLIOT, A. H., CHASSAING, G. & PROCHIANTZ, A. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 10444-10450.
- DESHAYES, S., MORRIS, M., HEITZ, F. & DIVITA, G. 2008. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 537-47.
- DUCHARDT, F., FOTIN-MLECZEK, M., SCHWARZ, H., FISCHER, R. & BROCK, R. 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, 8, 848-66.

- EL-ANDALOUSSI, S., JARVER, P., JOHANSSON, H. J. & LANGEL, U. 2007. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem J*, 407, 285-92.
- ELLIOTT, G. & O'HARE, P. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 88, 223-233.
- ERISTE, E., KURRIKOFF, K., SUHORUTSENKO, J., OSKOLKOV, N., COPOLOVICI, D. M., JONES, S., LAAKKONEN, P., HOWL, J. & LANGEL, U. 2013. Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug Chem*, 24, 305-13.
- EZZAT, K., ZAGHLOUL, E. M., EL ANDALOUSSI, S., LEHTO, T., EL-SAYED, R., MAGDY, T., SMITH, C. I. & LANGEL, U. 2012. Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J Control Release*, 162, 1-8.
- FAWELL, S., SEERY, J., DAIKH, Y., MOORE, C., CHEN, L. L., PEPINSKY, B. & BARSOUM, J. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 664-668.
- FITTIPALDI, A., FERRARI, A., ZOPPE, M., ARCANGELI, C., PELLEGRINI, V., BELTRAM, F. & GIACCA, M. 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem*, 278, 34141-9.
- FONSECA, S. B., PEREIRA, M. P. & KELLEY, S. O. 2009. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 953-64.
- FRANKEL, A. D. & PABO, C. O. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55, 1189-1193.
- FUTAKI, S., SUZUKI, T., OHASHI, W., YAGAMI, T., TANAKA, S., UEDA, K. & SUGIURA, Y. 2001. Arginine-rich peptides An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 5836-5840.
- GAO, X., KIM, K.-S. & LIU, D. 2007. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal*, 9, E92-E104.
- GLOVER, D. J., LIPPS, H. J. & JANS, D. A. 2005. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature Reviews Genetics*, 6, 299-310.
- GRDISA, M. 2011. The delivery of biologically active (therapeutic) peptides and proteins into cells. *Current medicinal chemistry*, 18, 1373-1379.
- GREEN, M. & LOEWENSTEIN, P. M. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat< I> Trans</I>-Activator Protein. *Cell*, 55, 1179-1188.
- GRÄSLUND, A. 2010. Mass Spectrometry. In: LANGEL, Ü., CRAVATT, B., GRÄSLUND, A., LAND, T., VON HEIJNE, G., NIESSEN, S. & ZORKO, M. (eds.) *Introduction to Peptides and Proteins*. 1 ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- GUPTA, B., LEVCHENKO, T. S. & TORCHILIN, V. P. 2005. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 637-51.

- HEITZ, F., MORRIS, M. C. & DIVITA, G. 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*, 157, 195-206.
- HOLLON, T. 2000. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Nature medicine*, 6, 6-6.
- HORTON, K. L., STEWART, K. M., FONSECA, S. B., GUO, Q. & KELLEY, S. O. 2008. Mitochondria-penetrating peptides. *Chem Biol*, 15, 375-82.
- HU, L. 2005. Prodrug Approaches to Drug Delivery. In: WANG, B., SIAHAAN, T. J. & SOLTERO, R. A. (eds.) *Drug delivery: principles and applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- JOHNSON, R., HARRISON, S. & MACLEAN, D. 2011. Therapeutic Applications of Cell-Penetrating Peptides In: LANGE, Ü. (ed.) *Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- JOLIOT, A., PERNELLE, C., DEAGOSTINI-BAZIN, H. & PROCHIANTZ, A. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1864-1868.
- JONES, A. T. 2008. Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm*, 354, 34-8.
- JÄRVER, P. & LANGE, Ü. 2004. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discovery Today*, 9, 395-402.
- KAISER, E., COLESCOTT, R., BOSSINGER, C. & COOK, P. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical biochemistry*, 34, 595-598.
- KAMEI, N., MORISHITA, M., EDA, Y., IDA, N., NISHIO, R. & TAKAYAMA, K. 2008. Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption. *Journal of Controlled Release*, 132, 21-25.
- KASPAR, A. A. & REICHERT, J. M. 2013. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov Today*, 18, 807-17.
- KIM, W. J., CHRISTENSEN, L. V., JO, S., YOCKMAN, J. W., JEONG, J. H., KIM, Y.-H. & KIM, S. W. 2006. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Molecular Therapy*, 14, 343-350.
- KOREN, E. & TORCHILIN, V. P. 2012. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol Med*, 18, 385-93.
- LANGE, Ü. 2011. *Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols*, Humana Press.
- LEE, S. H., CASTAGNER, B. & LEROUX, J. C. 2013. Is there a future for cell-penetrating peptides in oligonucleotide delivery? *Eur J Pharm Biopharm*, 85, 5-11.
- LEHTO, T., SIMONSON, O. E., MAGER, I., EZZAT, K., SORK, H., COPOLOVICI, D. M., VIOLA, J. R., ZAGHLOUL, E. M., LUNDIN, P., MORENO, P. M., MAE, M., OSKOLKOV, N., SUHORUTSENKO, J., SMITH, C. I. & ANDALOUSSI, S. E. 2011. A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 19, 1457-67.

- LINDGREN, M., HÄLLBRINK, M., PROCHIANTZ, A. & LANGEL, Ü. 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends in pharmacological sciences*, 21, 99-103.
- LINDGREN, M. & LANGEL, Ü. 2011. Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptides. In: LANGEL, Ü. (ed.) *Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- LO, S. L. & WANG, S. 2008. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials*, 29, 2408-14.
- LOPEZ-FRAGA, M., WRIGHT, N. & JIMENEZ, A. 2008. RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 8, 262-273.
- LUNDBERG, P. & LANGEL, Ü. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *Journal of Molecular Recognition*, 16, 227-233.
- LUNDIN, P., JOHANSSON, H., GUTERSTAM, P., HOLM, T., HANSEN, M., LANGEL, Ü. & EL ANDALOUSSI, S. 2008. Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 2535-2542.
- LÖFGREN, K., WAHLSTRÖM, A., LUNDBERG, P., LANGEL, Ü., GRÄSLUND, A. & BEDECS, K. 2008. Antiprion properties of prion protein-derived cell-penetrating peptides. *The FASEB Journal*, 22, 2177-2184.
- MACEWAN, S. R. & CHILKOTI, A. 2013. Harnessing the power of cell-penetrating peptides: activatable carriers for targeting systemic delivery of cancer therapeutics and imaging agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 5, 31-48.
- MAIOLO, J. R., FERRER, M. & OTTINGER, E. A. 2005. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1712, 161-72.
- MEHIER-HUMBERT, S. & GUY, R. H. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews*, 57, 733-753.
- MERRIFIELD, R. 1969. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32, 221-296.
- MILLETTI, F. 2012. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*, 17, 850-60.
- MORRIS, M., VIDAL, P., CHALOIN, L., HEITZ, F. & DIVITA, G. 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic acids research*, 25, 2730-2736.
- MORRIS, M. C., DESHAYES, S., HEITZ, F. & DIVITA, G. 2008. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell*, 100, 201-17.
- MÄE, M., ANDALOUSSI, S. E., LEHTO, T. & LANGEL, Ü. 2009a. Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, 1195-1205.
- MÄE, M., EL ANDALOUSSI, S., LUNDIN, P., OSKOLKOV, N., JOHANSSON, H. J., GUTERSTAM, P. & LANGEL, U. 2009b. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release*, 134, 221-7.
- MYRBERG, H., ZHANG, L., MÄE, M. & LANGEL, Ü. 2007. Design of a Tumor-Homing Cell-Penetrating Peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 70-75.

- OEHLKE, J., SCHELLER, A., WIESNER, B., KRAUSE, E., BEYERMANN, M., KLAUSCHENZ, E., MELZIG, M. & BIENERT, M. 1998. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1414, 127-139.
- OSKOLKOV, N., ARUKUUSK, P., COPOLOVICI, D.-M., LINDBERG, S., MARGUS, H., PADARI, K., POOGA, M. & LANGEL, Ü. 2011. NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 17, 147-157.
- PAN, C., XU, S., ZHOU, H., FU, Y., YE, M. & ZOU, H. 2007. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem*, 387, 193-204.
- POOGA, M., HÄLLBRINK, M. & ZORKO, M. 1998a. Cell penetration by transportan. *The FASEB journal*, 12, 67-77.
- POOGA, M., LINDGREN, M., HÄLLBRINK, M., BRÅKENHJELM, E. & LANGEL, Ü. 1998b. Galanin-Based Peptides, Galparan and Transportan, with Receptor-Dependent and Independent Activities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 863, 450-453.
- RICHARD, J. P., MELIKOV, K., BROOKS, H., PREVOT, P., LEBLEU, B. & CHERNOMORDIK, L. V. 2005. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem*, 280, 15300-6.
- SAAR, K., LINDGREN, M., HANSEN, M., EIRIKSDOTTIR, E., JIANG, Y., ROSENTHAL-AIZMAN, K., SASSIAN, M. & LANGEL, U. 2005. Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Anal Biochem*, 345, 55-65.
- SCHWARZE, S. R. 1999. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science*, 285, 1569-1572.
- SCHWARZE, S. R., HO, A., VOCERO-AKBANI, A. & DOWDY, S. F. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285, 1569-1572.
- SHIN, M. C., ZHANG, J., MIN, K. A., LEE, K., BYUN, Y., DAVID, A. E., HE, H. & YANG, V. C. 2014. Cell-penetrating peptides: achievements and challenges in application for cancer treatment. *J Biomed Mater Res A*, 102, 575-87.
- SOOMETS, U., LINDGREN, M., GALLET, X., HÄLLBRINK, M., ELMQUIST, A., BALASPIRI, L., ZORKO, M., POOGA, M., BRASSEUR, R. & LANGEL, Ü. 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1467, 165-176.
- STEWART, K. M., HORTON, K. L. & KELLEY, S. O. 2008. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem*, 6, 2242-55.
- ZIEGLER, A. 2008. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 580-97.
- ZORKO, M. 2010. Purification and Characterization of Proteins. In: LANGEL, Ü., CRAVATT, B., GRÄSLUND, A., LAND, T., VON HEIJNE, G., NIESSEN, S. & ZORKO, M. (eds.) *Introduction to Peptides and Proteins*. 1 ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

- ZORKO, M. & LANGEL, U. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 529-45.
- WADIA, J. S., STAN, R. V. & DOWDY, S. F. 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 10, 310-5.
- VASCONCELOS, L., PÄRN, K. & LANGEL, Ü. 2013. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Therapeutic Delivery*, 4, 573-591.
- VEIMAN, K. L., MAGER, I., EZZAT, K., MARGUS, H., LEHTO, T., LANGEL, K., KURRIKOFF, K., ARUKUUSK, P., SUHORUTSENKO, J., PADARI, K., POOGA, M., LEHTO, T. & LANGEL, U. 2013. PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol Pharm*, 10, 199-210.
- WENDER, P. A., MITCHELL, D. J., PATTABIRAMAN, K., PELKEY, E. T., STEINMAN, L. & ROTHBARD, J. B. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 13003-13008.
- VIOLA, J. R., EL-ANDALOUSSI, S., OPREA, I. I. & SMITH, C. E. 2010. Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert opinion on drug delivery*, 7, 721-735.
- VIVES, E., BRODIN, P. & LEBLEU, B. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16010-16017.

Tänuavaldused

Soovin südamest tänada Piret Arukuuske ja Ülo Langelit meisterliku juhendamise, konstruktiivse tagasiside ning kannatlikkuse eest. Lisaks lähevad tänusõnad Ly Pärnastele abivalmiduse ja vastutulelikkuse eest. Samuti tahan tänada laborikaaslaseid erudeeriva ja sõbraliku õhkkonna loomise eest.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siim Uhtjärv

(sünnikuupäev: 23.03.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „NickFect 51 uued analoogid plasmiidse DNA transportimiseks rakku“, mille juhendajad on Piret Arukuusk, PhD ja Prof Ülo Langel,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014